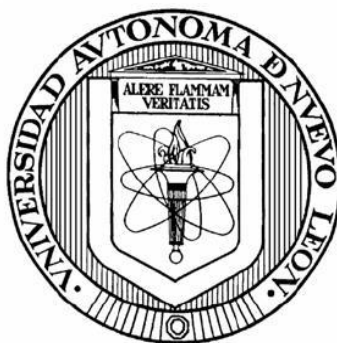


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMIA

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL



**DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS E
(VHE) EN CERDOS, MURINOS Y HUMANOS EN UNIDADES DE RIESGO
PORCINO DEL NORESTE DE MÉXICO.**

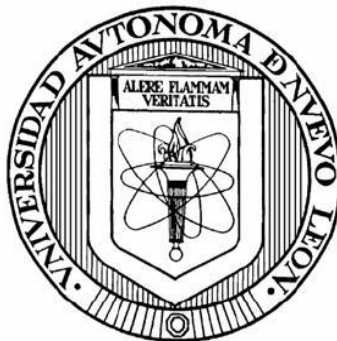
Por

MVZ. LORENA LETICIA VÁZQUEZ ÁVILA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

Septiembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

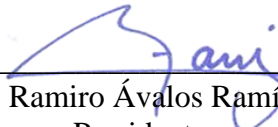


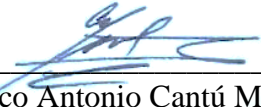
**DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS E
(VHE) EN CERDOS, MURINOS Y HUMANOS EN UNIDADES DE RIESGO**

PORCINO DEL NORESTE DE MÉXICO.

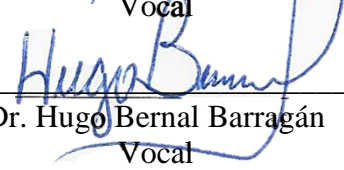
Aprobación de tesis por el comité particular de
MVZ. LORENA LETICIA VÁZQUEZ ÁVILA

Comité de Tesis


Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Presidente


Dr. Marco Antonio Cantú Martínez
Secretario


Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Vocal


Dr. Hugo Bernal Barragán
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS E
(VHE) EN CERDOS, MURINOS Y HUMANOS EN UNIDADES DE RIESGO
PORCINO DEL NORESTE DE MÉXICO.

Aprobación de tesis por el comité particular de
LORENA LETICIA VÁZQUEZ ÁVILA
Dirección de Tesis



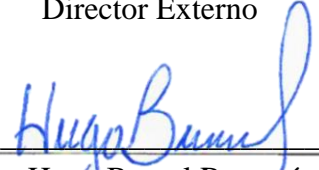
Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Director



Dra. Ana María Rivas Estilla
Director Externo



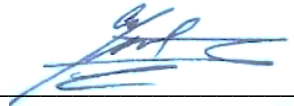
Dr. José C. Segura Correa
Co-Director Externo



Dr. Hugo Bernal Barragán
Co-Director



Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Co-Director



Dr. Marco A. Cantú Martínez
Co-Director

Este trabajo de tesis ha sido financiado a través de diversas vías:

Becas Nacionales CONACYT para estudios de Maestría (Posgrado) convocatoria 2019.

Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología (PAICYT) de la UANL convocatoria 2019.

Programa PAFI de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, convocatoria 2020.

Recursos propios y facilidades de la administración de la FMVZ-UANL otorgados por el Dr. Gustavo Moreno Degollado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramiro Ávalos, por transmitirme con sus conocimientos y confiar en mí. Por su tiempo y disposición para enseñarme y retroalimentarme en cada actividad que realizaba.

A mis co-asesores, el Dr. Marco Cantú por estar al pendiente de mí; el Dr. Hugo Bernal, por su disponibilidad para siempre apoyar y retroalimentar mi proyecto; la Dra. Sibilina Cedillo por transmitirme sus conocimientos; al Dr. José Segura, que siempre contribuyó en mi proyecto a distancia; y la Dra. Ana María Rivas, por estar en el proyecto.

A mis amigas Leslee y Pilar, por su apoyo tanto dentro como fuera como del laboratorio, ayudándome a sobrellevar las dificultades para seguir avanzando. Las quiero y aprecio mucho.

Al MC. Héctor Dávila, nuestro gran Héctor; fue un placer haber coincidido contigo. Nos conocimos aprendiendo juntos y compartiendo nuestras experiencias que se volvió una amistad. Gracias por estar conmigo durante mi tesis de licenciatura. Gracias por tu apoyo y ánimos durante Maestría. Honraré tu nombre por el gran ser humano que fuiste. Te respeto, te admiro y te aprecio. Nunca te olvidaré. †

Al Dr. Jaime Hernández, que siempre me ha motivado para continuar creciendo profesionalmente y siempre se tomó el tiempo de escucharme por lo que es una persona que aprecio mucho.

A la Dra. Heidi Rodríguez, Lupita y el MVZ. Ricardo, que me ayudaron a comenzar con el muestreo. Aprendí y me divertí mucho con su compañía.

A todos mis compañeros de maestría; pero en especial a Frida, los Víctor's y Carlos, que siempre nos acompañamos dentro y fuera de la escuela, e hicieron que disfrutara mucho esta etapa de mi vida.

A Lizeth; una persona muy importante para mí y una gran enfermera que, a pesar de sus actividades, siempre se dio el tiempo de trabajar conmigo en el proyecto.

Finalmente, a cada médico y persona que se prestó al muestreo de este estudio.

DEDICATORIA

A Dios:

Por poner a las personas indicadas en mi vida que me ayudan a crecer como persona y profesionalmente.

A mis padres:

Por su apoyo incondicional para cumplir mis metas y objetivos. Por enseñarme que para aprender hay que estar en constante cambio, disfrutando cada día haciendo lo que me gusta a pesar de las adversidades.

A mi pareja:

Mi Leonardo; conocerte fue lo mejor de esta etapa; lejos de incitar algo negativo en mis estudios, siempre me motivas para dar lo mejor de mí y me acompañas en mis metas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	4
1.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3. HIPÓTESIS.....	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. VIROLOGÍA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE).....	6
2.1.1. TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN.....	6
2.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA PARTÍCULA VIRAL Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.....	9
2.1.3. GENOMA: ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y PROTEÍNAS DEL VHE.....	10
2.1.3.1. ORF1: PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NSP).....	12
2.1.3.2. ORF2: PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE.....	13
2.1.3.3. ORF3: PROTEÍNAS MULTIFUNCIONALES.....	14
2.1.4. MECANISMO DE INFECCION Y REPLICACION DEL VHE....	15
2.1.4.1. REPLICACIÓN EXTRAHEPÁTICA.....	19
2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATITIS E.....	21
2.2.1. DISTRIBUCIÓN.....	21
2.2.2. HEPATITIS E EN HUMANOS.....	24

2.2.2.1.	VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	25
2.2.2.2.	FACTORES DE RIESGO EN HUMANOS.....	26
2.2.2.3.	ZOONOSIS.....	27
2.2.3.	HEPATITIS E EN ANIMALES.....	27
2.2.3.1.	ESPECIES RESERVORIAS.....	28
2.2.3.2.	INFECCIÓN DEL VHE EN PORCINOS DOMÉSTICOS.....	29
2.2.3.3.	INFECCIÓN DEL VHE EN MURINOS.....	33
2.3.	TÉCNICAS PARA LA DETENCIÓN DEL VHE.....	34
2.3.1.	SISTEMAS DE CULTIVO CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATITIS E.....	35
2.3.2.	MODELOS ANIMALES PARA SU ESTUDIO.....	36
2.4.	ESTADO ACTUAL DE LA HEPATITIS E EN MÉXICO.....	36
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1.	ÁREA DE TRABAJO.....	39
3.2.	ÁREA Y CARACTERÍSTICAS DEL TERRITORIO DE ESTUDIO...	39
3.3.	COLECTA DE MUESTRAS.....	39
3.3.1.	TAMAÑO DE MUESTRA.....	40
3.3.2.	MUESTREO EN HUMANOS.....	40
3.3.3.	MUESTREO EN PORCINOS.....	41
3.3.4.	MUESTREO EN MURINOS.....	41
3.4.	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VHE.....	42
3.5.	ENCUESTAS PARA ASOCIAR FACTORES DE PREDISPOSICIÓN CON LA SEROPOSITIVIDAD.....	42
3.6.	CULTIVO CELULAR PARA EL AISLAMIENTO DEL VHE.....	43
3.7.	DETECCIÓN DEL VHE MEDIANTE RT-PCR SEMI-ANIDADO....	44
3.7.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS.....	44
3.7.1.1.	EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE SUEROS HUMANOS Y SOBRENADANTE DE CULTIVOS CELULARES.....	45
3.7.1.2.	EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE EXCREMENTO PORCINO.....	45

3.7.1.3.	EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATAS.....	45
3.7.2.	DETECCIÓN DEL VHE POR RT-PCR SEMI-ANIDADO.....	46
3.8.	ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.....	49
3.9.	PURIFICACIÓN DEL cDNA.....	49
3.10.	SECUENCIACIÓN MUESTRAS Y ANÁLISIS.....	50
4.	RESULTADOS.....	51
4.1.	COLECTA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO.....	51
4.2.	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VHE.....	52
4.2.1.	SEROLOGÍA EN MUESTRAS HUMANAS.....	52
4.2.2.	SEROLOGÍA EN PORCINOS Y MURINOS.....	54
4.2.3.	RESULTADOS DE SEROLOGÍA A NIVEL DE UNIDAD DE RIESGO.....	55
4.3.	ASOCIACIÓN DE SEROPOSITIVIDAD CON FACTORES DE PREDISPOSICIÓN.....	55
4.4.	CULTIVO CELULAR PARA EL AISLAMIENTO DEL VHE.....	56
4.5.	DETECCIÓN POR RT-PCR SEMI-ANIDADO.....	57
4.5.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS.....	57
4.5.2.	DETECCIÓN DEL VHE POR RT-PCR SEMI-ANIDADO.....	58
5.	DISCUSIÓN.....	62
6.	CONCLUSIONES.....	66
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
8.	ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Clasificación de la familia Hepeviridae.....	8
Cuadro 2. Manifestaciones clínicas extrahepáticas en humanos.....	20
Cuadro 3. Primers utilizados para el método de RT-PCR semi-anidado.....	46
Cuadro 4. Componentes de la reacción para la RT-PCR.....	47
Cuadro 5. Protocolo y condiciones de temperatura de la técnica del RT-PCR...	47
Cuadro 6. Componentes de la reacción para PCR semi-anidada.....	48
Cuadro 7. Protocolo y condiciones de temperatura de la técnica de PCR semi-anidada.....	48
Cuadro 8. Muestras de humanos obtenidas por municipio.....	54
Cuadro 9. Variables asociadas a la seropositividad del VHE.....	56
Cuadro 10. Variables asociadas a la ausencia del VHE.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contraste negativo de micrografía electrónica en viriones del VHE en humanos aislados a partir de muestras fecales en Nepal.....	9
Figura 2. Estructura del genoma del virus de hepatitis E.....	11
Figura 3. Estructura de partículas virales del VHE.....	14
Figura 4. Ciclo de replicación del virus de hepatitis E (VHE) y virus de hepatitis E cuasi-envuelto.....	16
Figura 5. Liberación de viriones nuevos del VHE.....	19
Figura 6. Distribución mundial de los genotipos del VHE.....	23
Figura 7. Esquema del curso de la infección del VHE en humanos.....	25
Figura 8. Curso de la infección causada por el VHE en cerdos.....	30
Figura 9. Distribución de las unidades de riesgo porcino muestreadas.....	52
Figura 10. Proporción de los oficios del total de individuos muestreados.....	53
Figura 11. Proporción de cerdos seropositivos a anticuerpos IgG contra el VHE.....	54
Figura 12. Efecto citopático en células A549.....	57
Figura 13. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada del agua residual.....	58
Figura 14. Resultado de la electroforesis posterior a la purificación del cDNA del fragmento de interés.....	59
Figura 15. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada muestras de excremento.....	60
Figura 16. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada muestras de tejido hepático en ratas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

HEV	Hepatitis E Virus
HEVe	Hepatitis E Virus cuasi-enveloped
gnt	Genotipo
URP	Unidad de riesgo porcino
ORF	Open Reading Frame o Marco de Lectura Abierto
kb	Kilobases
AUG	Codón; sitio de iniciación
NSP	Nonstructural protein o proteínas no estructurales
µg	Microgramo
M	Molar
g	Gravedades
µm	Micrómetro
mm	Milimetro
µl	Microlitro
CPE	Cytopathogenic effect o efecto citopatogénico
mg	Miligramo
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
ng	Nanogramos
pg	Picogramos
µg	Microgramos

RESUMEN

El virus de la Hepatitis E (VHE) es un virus de importancia en salud pública y de amplia distribución mundial, que presenta gran variación genética y extenso tropismo por diferentes especies animales. En México se ha reportado la presencia de los genotipos VHE-2 y VHE-3, de los cuales se desconoce su prevalencia, particularmente en las poblaciones de riesgo. Se realizó un estudio transversal de agosto del 2019 a junio del 2021 con el propósito de estimar las frecuencias serológica y molecular del VHE en humanos, cerdos y ratas que cohabitan en unidades de riesgo porcino (URP) en el noreste de México. El tamaño de muestras fue calculado para detectar cuando menos a un individuo seropositivo o con el genoma del VHE. Se consideraron 12 granjas tecnificadas, 2 rastros porcinos y 5 URP de traspatio. Se analizaron 25 sueros humanos, 128 sueros porcinos y 13 sueros de ratas para la detección de anticuerpos anti-VHE. La detección molecular del virus fue realizada mediante RT-PCR semi-anidada a partir de 20 sueros de humanos, 19 pools de excreta fecal porcina y 13 muestras de tejido hepático de rata de las URP. De los sueros humanos y porcinos, 20% (5/25) y 49% (63/128) respectivamente, resultaron positivos para la detección de anticuerpos contra el VHE-3. Las ratas resultaron seronegativas a la presencia de anticuerpos anti-VHE. Secuencias genéticas del VHE fueron detectadas en el 11% (2/19) de los pools de excremento porcino y en el 15% (2/13) de hígado de ratas. Los sueros humanos resultaron negativos para la presencia del genoma viral. Mediante la prueba de χ^2 no se encontró asociación entre factores predisponentes y la serología contra el VHE en los trabajadores de la URP. Adicionalmente, se inocularon cultivos celulares de la línea A549 con extractos de materia fecal de granjas seropositivas para aislar el virus, sin embargo, resultaron negativas a la detección molecular después de 3-4 pasajes de los cultivos celulares. Los resultados obtenidos confirman la presencia y circulación del virus en las URP analizadas y se estima, por vez primera en el Noreste de México la frecuencia serológica en humanos laboralmente expuestos a animales infectados con el VHE, así como la presencia del virus en las ratas que cohabitan en estas unidades de riesgo.

Palabras clave: hepatitis E, VHE, porcino, ratas, exposición ocupacional.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a virus of public health importance and worldwide distribution, which presents great genetic variation and extensive tropism for different animal species. In Mexico, the presence of HEV-2 and HEV-3 genotypes has been reported, but their prevalence is unknown, particularly in at-risk populations. A cross-sectional study was conducted from August 2019 to June 2021 with the purpose of estimating the serological and molecular frequencies of HEV in humans, pigs and rats cohabiting in swine risk units (PRU) in northeastern Mexico. The sample size was calculated to detect at least one individual seropositive or with the HEV genome. Twelve technified farms, two swine slaughterhouses and five backyard PRUs were considered. Twenty-five human sera, 128 swine sera and 13 rat sera were tested for anti-HEV antibodies. Molecular detection of the virus was performed by semi-nested RT-PCR from 20 human sera, 19 pools of swine fecal excreta and 13 rat liver tissue samples from the PRUs. Of the human and porcine sera, 20% (5/25) and 49% (63/128), respectively, were positive for HEV-3 antibody detection. Rats were seronegative for the presence of HEV antibodies. HEV gene sequences were detected in 11% (2/19) of swine excreta pools and 15% (2/13) of rat liver. Human sera were negative for the presence of the viral genome. By χ^2 test, no association was found between predisposing factors and serology against HEV in PRU workers. In addition, cell cultures of the A549 line were inoculated with fecal extracts from seropositive farms to isolate the virus; however, they were negative for molecular detection after 3-4 passages of the cell cultures. The results obtained confirm the presence and circulation of the virus in the PRUs analyzed and, for the first time in Northeastern Mexico, the serological frequency in humans exposed to EHV-infected animals is estimated, as well as the presence of the virus in rats cohabiting in these risk units.

Key words: hepatitis E, HEV, swine, rats, occupational exposure.

1. INTRODUCCIÓN

Las hepatitis son padecimientos causados primeramente por agentes virales que afectan el hígado. Actualmente se conocen 5 agentes virales causantes de hepatitis: el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis D (VHD), y el virus de la hepatitis E (VHE). Los VHB, VHC y VHD son transmitidos por vía parenteral y, el VHA y VHE son transmitidos de manera enteral. Todos son de gran importancia en la salud pública por afectar a la población humana (Gupta, 2018).

La hepatitis E es una enfermedad aguda autolimitada con una amplia distribución; sin embargo, en Asia central y sudoriental, norte y oeste de África, y México se consideran zonas hiperendémicas puesto que la seroprevalencia mayor al 25%. Los reportes de hepatitis E en Norteamérica y Europa son menores, ya que la seroprevalencia oscila en 5%. A pesar de ello, con el paso del tiempo, estos reportes se han ido observado en aumento a causa del turismo de áreas no endémicas hacia zonas de riesgo (Rodríguez et al., 2012).

Esta enfermedad se transmite principalmente por vía fecal-oral, por lo que está relacionada al consumo de agua contaminada y productos cárnicos sin cocción adecuada. También se han descrito otras vías de transmisión como la transfusión de hemoderivados infectados, trasplantes y transmisión materno-fetal (Spahr et al., 2017).

La hepatitis E es causada por un virus icosaédrico desnudo con un genoma formado por una hebra de ARN polaridad positiva. El VHE pertenece al género *Orthohepevirus* de la familia *Hepeviridae* (Smith et al., 2014). El género *Orthohepevirus* abarca cuatro especies o subgéneros, de la A – D (Purdy et al., 2017). Dentro del subgénero *Orthohepevirus A* se encuentran ocho genotipos del VHE, los cuales algunos de éstos se han reportado como zoonosis o potencialmente zoonóticos. Los genotipos identificados y reconocidos hasta la fecha son: el VHE-1 y VHE-2, que afectan sólo a humanos; el VHE-3 y VHE-4, que infecta principalmente a porcinos, pero debido a sus características tiene tropismo por una amplia gama de mamíferos, incluyendo a los humanos (Meng, 2016); el VHE-5 y VHE-6, detectados sólo en jabalíes; y los genotipos VHE-7 y VHE-8 que

infectan a dromedarios y camellos bactrianos respectivamente (Woo et al., 2016). Todos los genotipos del VHE descubiertos en animales podrían infectar al humano por lo que se continúa analizando su potencial zoonótico (Woo et al., 2016; Spahr et al., 2017). Considerando lo antes mencionado, las investigaciones para detectar al VHE en los reservorios animales, principalmente de los genotipos VHE-3 y VHE-4, son fundamentales para la prevención y control de esta zoonosis.

Hasta ahora, la gama de especies de mamíferos que el VHE puede infectar es muy amplia y continúa aumentando, por lo que es un área de estudio continuo, al igual que reconocer las características del virus para adaptarse a diferentes organismos.

Desde hace más de 30 años se considera que México es un país endémico para el VHE-2 en la población humana. Recientemente se ha detectado la presencia del virus en humanos como en cerdos. Sin embargo, si bien se reportan altos índices de seropositividad en la población porcina del país (García et al., 2017), la información sobre la presencia, frecuencia y distribución del VHE-3 en humanos es escasa o no existe, por lo que la epidemiología de este genotipo zoonótico no se conoce. Además, este tipo de hepatitis es de las menos estudiadas en el país (Sarmiento & Arenas, 2019).

Existe la suposición de que el VHE-3 es común en las granjas porcinas lo que indicaría altas tasas de transmisión entre estos animales y eventualmente es probable que humanos y otras especies animales en contacto directo o indirecto con cerdos puedan adquirir esta enfermedad (García et al., 2017; Panduro et al., 2011). De esta manera, la presencia del VHE en el medio ambiente representa un riesgo para la salud humana, principalmente para las personas que laboran o tienen contacto con porcinos.

El objetivo del presente trabajo es aportar información epidemiológica en México que permita demostrar la presencia serológica y molecular del VHE en cerdos, ratas y humanos que coexisten en granjas porcinas, denominadas como unidades de riesgo en el noreste del país.

1.1. JUSTIFICACIÓN

El virus de la Hepatitis E (VHE) es un patógeno zoonótico emergente y de amplia distribución mundial. Hasta la fecha se ha reconocido que el virus es endémico en México, reconociéndose su presencia tanto en humanos como en porcinos. No obstante, a nivel mundial se ha reportado la presencia en otras especies animales, con genotipos potencialmente zoonóticos. En México y particularmente en la zona noreste, esto es desconocido. Igualmente se desconoce la frecuencia de infección en las poblaciones humanas en riesgo.

Estas condiciones, asociadas a que usualmente la infección se cursa de manera asintomática en los reservorios, plantean la necesidad de conocer los factores epidemiológicos que posibilitan su presencia y circulación en el área de estudio. Dentro de estos factores es importante determinar si ocurre la presencia en otros hospederos, además de los señalados, que puedan constituir un riesgo a la salud animal y pública.

Por consiguiente, en la presente investigación se determinará la presencia de secuencias genéticas del VHE mediante RT-PCR anidada en muestras de humanos, cerdos y ratas que coexisten en granjas porcinas. En estas mismas poblaciones se determinará la presencia de anticuerpos VHE específicos de los genotipos 1 y 3 mediante ELISA indirecta e inmunocromatografía comercial. Ambos datos se usarán para estimar la frecuencia de infección en humanos, cerdos (a nivel de granja) y ratas y su posible asociación con factores de riesgo presentes en esta zona del país.

1.2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

1.2.1. Objetivo general

Determinar la presencia serológica y molecular del virus de hepatitis E (VHE) en cerdos, murinos y humanos que cohabitan en unidades de riesgo de los Estados de Nuevo León y Coahuila de Zaragoza, México.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Detectar la presencia de anticuerpos contra el VHE en humanos, murinos y cerdos que cohabitan en las distintas unidades de riesgo mediante serología.
2. Evidenciar la presencia de secuencias genéticas del VHE mediante RT-PCR anidado en tejido hepático y excretas en murinos; suero y heces en porcinos y suero en humanos.
3. Asociar la seropositividad en humanos con algunos factores predisponentes de infección por VHE.
4. Asociar la seropositividad en granjas porcinas con factores predisponentes y la bioseguridad.

1.3. HIPÓTESIS

El virus de la Hepatitis E (VHE) está presente y circulante en porcinos, murinos y humanos que cohabitan en unidades de riesgo en los estados de Nuevo León y Coahuila de Zaragoza, México.

2. ANTECEDENTES

2.1. Virología del virus de la hepatitis E (VHE)

El virus posee características genéticas que le permite infectar a una extensa variedad de especies, para lo cual, su adaptación a distintos entornos ha sido fundamental. En este apartado se hará una descripción de aspectos genéticos, filogenéticos, propiedades fisicoquímicas y replicación para comprender la historia natural de este agente infeccioso.

2.1.1. Taxonomía y clasificación

Los genotipos del virus de hepatitis E que se conocen actualmente, forman parte de la familia *Hepeviridae* (Cuadro 1). Dentro de ésta familia se incluyen los géneros *Pschihepevirus*, que infecta a peces, y *Orthohepevirus*, que infecta a una amplia gama de mamíferos y aves. Los genotipos pertenecientes a este último género poseen mucha relevancia, debido a que algunos de ellos son capaces de infectar a humanos (Purdy et al., 2017).

El género *Orthohepevirus* se divide en los subgéneros: *A*, *B*, *C* y *D*. Dentro del subgénero *A* se encuentran los ocho genotipos. Los genotipos VHE -1 y VHE -2 que infecta a humanos. Los genotipos VHE -3 y VHE-4, como reservorio primario a los porcinos, pero las características de éstos le permiten adaptarse a otros organismos, facilitando la infección a otros mamíferos incluyendo a los humanos, por lo que son zoonóticos. Los genotipos VHE-5 y VHE-6 sólo han sido detectados en jabalíes. El genotipo VHE-7, fue descubierto recientemente en dromedarios y aunque es potencialmente zoonótico aún se mantiene en investigación. Finalmente, el genotipo VHE-8, detectado en dromedarios y, al igual que el VHE-7, aún se realizan estudios por ser un posible riesgo para la salud humana (Meng, 2016; Rodríguez et al., 2012; Spahr et al., 2017; Woo et al., 2016).

En cuanto a los demás subgéneros, el *B* infecta aves; el *C* infecta ratas, hurones, musarañas, peramélidos y visones; y el *D* sólo a murciélagos (Smith et al., 2014; Purdy et al., 2017).

La clasificación de cada uno de los genotipos se debe a la diferencia de distancias de los aminoácidos de los marcos de lectura abierto (ORF) 1 y 2 concatenados (éstas estructuras de describen detalladamente en los apartados 2.1.3.1. y 2.1.3.2.)

Conforme se han realizado estudios y se ha actualizado la información referente a la clasificación taxonómica, genética y filogenética, han surgido variantes genéticas de los genotipos ya establecidos, es decir, subtipos. Los criterios para considerar y establecer un subtipo del VHE se han ido adaptando por lo que causa confusión y no existe un consenso claro para su establecimiento debido principalmente a las inconsistencias observadas para la asignación de secuencias genómicas a un determinado subtipo basado en las distancias filogenéticas (Smith et al., 2020).

Sin embargo, análisis filogenéticos de secuencias completas de la especie *Orthohepevirus A* han detectado 8 genotipos y 36 subtipos, los cuales se distribuyen de la siguiente manera. Del genotipo 1 se reconocieron los subtipos 1 y 1a al 1g. Del genotipo 2 se establecieron los subtipos 2a y 2b. Del genotipo 3, los subtipos 3a-3m y 3ar. Del genotipo 4, los subtipos 4a-4i. Del genotipo 5 solo se reconoció subtipo 5a. Del genotipo 6 los subtipos 6 y 6a. Del genotipo 7 los subtipos 7 y 7a; y del genotipo 8, el subtipo 8a (Smith et al., 2020).

Cuadro 1. Clasificación de la familia *Hepeviridae* (Pavio et al., 2015)

Familia	Género	Especie	Prototipo aislado	Acceso GenBank	Especies hospederas predominantes	Genotipo	Cepa de referencia	Acceso a referencia
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirus</i>	<i>Orthohepevirus A</i>	Burma	M73218	Humano			
			Burma	M73218	Humano			
			Burma	M73218	Humano	VHE-1	Burma	
					Humano	VHE-2	México	
					Humano, cerdos, conejos, venados, mangosta	VHE-3	Meng	
					Humano, cerdo	VHE-4	TI	AJ272108
					Jabalí	VHE-5	JBOAR135-Shiz09	AB573435
					Jabalí	VHE-6	wbJOY_06	AB602441
					Camello	VHE-7	DcHEV-178C	KJ496143
					Camello bactriano	VHE-8		
		<i>Orthohepevirus B</i>	F93-5077	AY535004	Pollo			
		<i>Orthohepevirus C</i>	R63	GU345042	Rata	VHE-C1	R63	GU345042
						VHE-C2	FRHEV4	JN998606
		<i>Orthohepevirus D</i>	BatHEV/B S/GE/2009	JQ001749	Murcielago			
	<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus A</i>	Heenan Lake	HQ731075	Trucha			

2.1.2. Características de la partícula viral y propiedades fisicoquímicas

El virión del VHE tiene forma esférica icosaédrica, no posee envoltura y mide entre 27-34nm. La cápside se conforma de capsómeros formados de homodímeros de una sola proteína de la cápside. Cada proteína dispone de tres dominios estructurales: S, P1 (protuberancias triples) y P2 (protuberancias picudas dobles con epítopes neutralizantes). Cada dominio interactúa con receptores celulares (Figura 1) (Mori & Matsura, 2011).

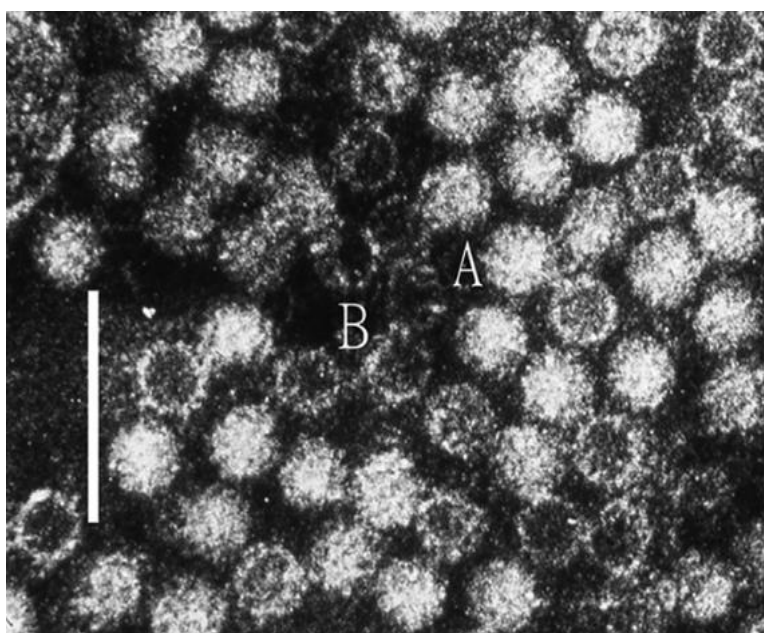


Figura 1. Contraste negativo de micrografía electrónica en viriones del VHE en humanos aislados a partir de muestras fecales en Nepal. A) señala los viriones; B) muestra la cápside viral (Purdy et al., 2017).

El virus puede permanecer estable bajo condiciones ligeramente ácidas y alcalinas, facilitando su paso por el tracto gastrointestinal. Además, tiene una ligera resistencia a las altas temperaturas. Por ello, los viriones en hígado de cerdos para su consumo se pueden hacer infectivos al mantenerlos a 56 °C durante 1 hora y se puede inactivar al hervir o freír por 5 minutos (Khuroo et al., 2016).

El virión tampoco se ve afectado por soluciones que contengan cloroformo y/o éter, pero las soluciones con monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano, comercialmente conocido como Tween 20, diluido al 0.05% y formalina al 0.05% pueden reducir su infectividad. Así mismo, el VHE es susceptible al cloro, por lo que se recomienda realizar desinfección con este compuesto en casos de epidemias, brotes o en las suministradoras de agua (Girones et al., 2014).

2.1.3. Genoma: organización genética y proteínas del VHE

El genoma viral está conformado por un ARN monocatenario de polaridad positiva que tiene un peso molecular de 7.2 kb. Incluye tres regiones codificantes de proteínas u ORF's: ORF1, ORF2 y ORF3. Cada ORF corresponde a proteínas con funciones específicas para concretar el ciclo de replicación del VHE (Khuroo et al., 2016).

En el extremo 5' posee una cubierta con 7-metilguanosina y contiene una cadena poli A en su extremo 3' (Khuroo et al., 2016).

Asimismo, contiene dos regiones no traducidas (NTR), una en el extremo 5' de 27 nucleótidos y otra en el extremo 3' de 65 nucleótidos, así como también una región conservada de 58 nucleótidos localizada cerca del extremo 5'. Ambas NTR se pliegan formando estructuras de “tallo y horquilla/lazo”, importantes para la replicación y transcripción del VHE. Además del ARN genómico, tiene una región de ARN subgenómico bicistrónico (sgARN) de 2.2 kb (Figura 2). Ambas partes conforman el genoma completo, fundamental para la traducción de proteínas y la replicación viral (Rodríguez et al., 2012).

El ORF1 se traduce a partir del ARN actuando como ARN mensajero (ARNm) y, el ORF2 y ORF3 se traducen a partir del ARN subgenómico bicistrónico con dos codones AUG ubicados en centro del genoma. El ORF3 se superpone con la secuencia de ORF2 por 328 nucleótidos en el extremo 3' (Figura 2) (Khuroo et al., 2016).

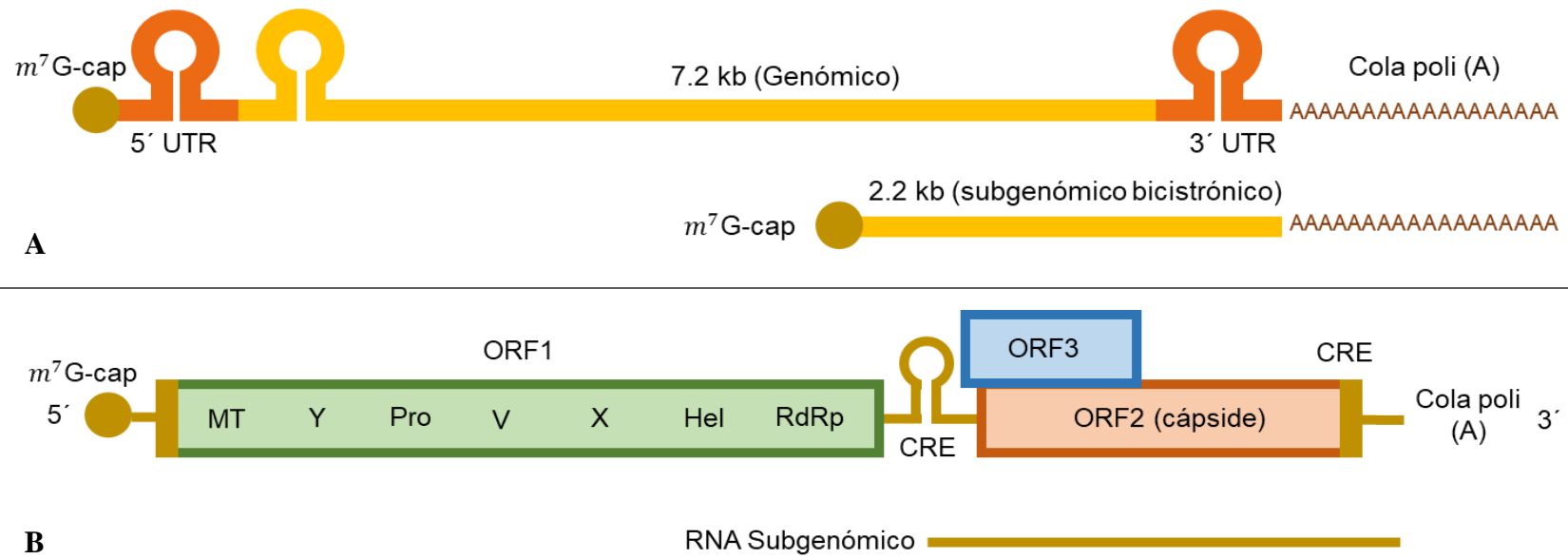


Figura 2. Estructura del genoma del virus de hepatitis E. A) Tamaño y estructuras del ARN genómico y ARN subgenómico bicistrónico; B) Organización de los marcos de lectura abierto y sus dominios (adaptado de Khuroo et al., 2016).

2.1.3.1. ORF1: proteínas no estructurales (NSP)

Las proteínas no estructurales están codificadas a partir de ORF1, que está en posición 5' y el cual ocupa dos tercios del genoma viral, codifica para una poliproteína, la proORF1, que está formada por 1,693 aminoácidos (aa) (Khuroo et al., 2016).

La proORF1 tiene motivos estructurales y funcionales durante la replicación viral, por el cual reconocen varios dominios: el dominio para metiltransferasa (MetTrf) de 56-240 aa, que cataliza la protección (cap) para el ARN vírico; el dominio Y de 216-442 aa; el dominio cisteína-proteasa (Cys-Prot) tipo papaína (PCP) de 433-592 aa; un dominio de bisagra rico en prolina V (HVR) de 712-778 aa; un macrodominio X de 785-945 aa; un dominio para una ARN helicasa (Hel) de 960-1204 aa y otro para ARN polimerasa (ARN-pol) dependiente de ARN (RdRp) de 1207-1693 aa (Khuroo et al., 2016; Cao & Meng, 2012).

Cada segmento de este marco de lectura abierto ha sido estudiado para comprender a profundidad la infección por el virus y su tropismo a distintos mamíferos. Cada sección tiene funciones específicas que se podrían tener aplicaciones clínicas y reducir la replicación viral y, por tanto, prevenir las consecuencias de la infección.

La primera región corresponde a la metiltransferasa, responsable del cubrir el genoma y permite la transferencia de un grupo metilo trifosfato de guanosina (GTP) que se acopla covalentemente al 5' final del genoma. La alteración o afectación de este dominio puede tener efectos antivirales (Magden et al., 2001).

El dominio Y es una región altamente conservada y, al igual que la metiltransferasa, se ha evidenciado que las mutaciones inducen la no viabilidad de las partículas virales, principalmente en el genotipo VHE-1, cuestionando las consecuencias tras la alteración de estas regiones en otros genotipos (LeDesma et al., 2019).

A continuación, se encuentra una región de proteasa o dominio putativo de cisteína proteasa (PCP) similar a papaína. Aunque se ha estudiado ampliamente para determinar su función, los resultados son contradictorios. Sin embargo, se tienen algunas hipótesis como que actúa como una proteasa codificada viralmente que procesa la poliproteína del

VHE, o lo contrario con una actividad proteolítica y con dianas celulares (LeDesma et al., 2019).

Junto al dominio PCP se ubica una región hipervariable (V), denominada así por su gran divergencia a diferencia de otros dominios del genoma viral, dificultando su alineación. Su función es estructural para cada región del ORF1, como una bisagra. Además, en procesos de infección puede adquirir inserciones que favorezcan la replicación viral (Smith, et al. 2012; LeDesma et al., 2019).

El dominio X o “macrodominio”, es denominado así por su similitud con secuencias de las moléculas de unión a ribosoma ADP humanas que también poseen macrodominios. Este segmento tiene como función unirse a la poli-ADP ribosomal y secundar la replicación con la traducción de proteínas (Karras et al., 2005).

El dominio de la helicasa desenrolla los dúplex de ARN mediante hidrólisis de NTP y es responsable de la actividad de la NTPasa. Esta enzima pertenece a la superfamilia 1, con siete segmentos conservados: el I, Ia, II, III, IV, V y VI (Kadaré & Haenni, 1997; LeDesma et al., 2019).

Al final se localiza la región de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp), que filogenéticamente se encuentra en el supergrupo III (Van Der Heijden et al., 2002; LeDesma et al., 2019).

2.1.3.2. ORF2: proteínas de la cápside

El ORF2 se encuentra en posición 3' y codifica para la proORF2 formada de 660 aa. Esta proteína parte de la cápside viral y participa en el ensamblaje de los viriones nuevos, así como también en la interacción virus-célula (Khuroo et al., 2016).

La cápside viral contiene aproximadamente 180 moléculas de proORF2 por partícula viral. También tiene tres sitios de glucosilación en residuos de asparaginas 137, 310 y 562 y tres dominios lineales: el dominio S de 119-319 aa con función estructural, el dominio M de 320-454 aa y el dominio P de 320-606 aa, en donde ocurre la unión con

anticuerpos neutralizantes. Los dominios M y P contribuyen a la interacción virus-célula huésped (Cao & Meng, 2012) (Figura 3).

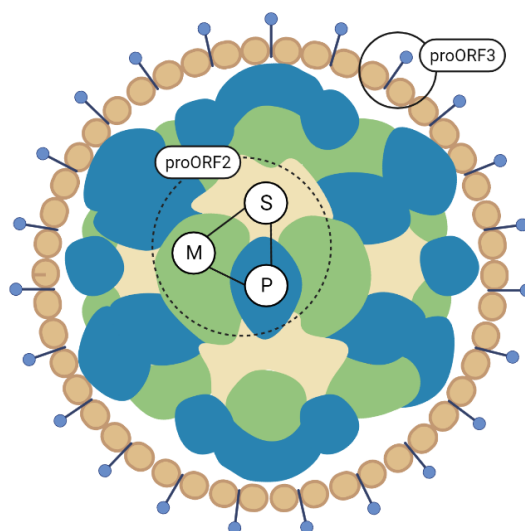


Figura 3. Estructura de partículas virales del VHE. Localización de proteínas proORF2 de la cápside y la localización de los dominios P, S y M, así como también la posible ubicación de proORF3 (Adaptado de Rodríguez et al., 2012).

2.1.3.3. ORF3: proteínas multifuncionales

Finalmente, la ORF3 codifica para la fosfoproteína proORF3 de 114 aa traducida del ARNm subgenómico a partir del tercer codón AUG de ORF2. Esta región tiene una longitud de 345 nucleótidos iniciando en el nucleótido 5133 y termina en el nucleótido 5477 (Khuroo et al., 2016; Cao & Meng, 2012).

El extremo N terminal de esta proteína rica en cisteínas, se une al ARN viral formando un complejo junto con la cápside viral. El C terminal tiene varios dominios que tienen funciones distintas, pero en general interactúan con las proteínas celulares asociadas a la morfogénesis de los viriones y su infectividad; estos dominios son: el D1, que se une a una Mitogen Activated Protein-fosfatasa-cinasa y se posicionan en el

citoesqueleto y activa la cinasa regulada extracelularmente (ERK), ambos procesos constituyen una señal que ayudará a la supervivencia celular; y el D2 realiza una interacción con una glucoproteína presente en plasma durante la fase aguda llamada hemopexina, la cual desciende al igual que la haptoglobina durante la infección. La función de los dominios D1 y D2 de la proORF3 inhiben la respuesta innata del huésped reduciendo la expresión de proteínas y, por consiguiente, disminuye la respuesta inflamatoria durante esta fase (Cao & Meng, 2012).

Dentro de proORF3 se incluyen dos regiones ricas en prolinas: P1, que se encuentra en todas las cepas del virus de hepatitis E y, P2 que se une a proteínas con dominios SH3 y se asocia con la liberación del virus (Khuroo et al., 2016; Cao & Meng, 2012).

La función de proORF3 es hacer interacción con los componentes celulares alargando la vida de la célula huésped y atenuando respuesta inmune, no solo por la función del D2 sino también, aumentando la liberación de α 1-microglobulina, la cual suprime de manera parcial la respuesta inmune de linfocitos y neutrófilos, todo esto con el fin de favorecer la replicación viral (Cao & Meng, 2012).

2.1.4. Mecanismo de infección y replicación del VHE

El VHE puede presentarse de dos formas que son antigénicamente distintos para el organismo del hospedero. Estas formas de presentación pueden ser: como virión desnudo (VHE), que se elimina en heces e interactúa directamente con la superficie de la célula hospedera y, como virión cuasi envuelto (VHEe), el cual pueden viajar en sangre y posee una cápside formada a partir de la membrana la célula (Ju & Ding, 2019).

Cuando un individuo tiene contacto con el VHE por primera vez, éste será en forma de virión desnudo. La ruta de transmisión permite al virión tener contacto con el tracto gastrointestinal y así poder movilizarse a través de la vena porta hacia los hepatocitos, sus células blanco (Yin et al., 2016).

Una vez que se encuentra en tejido hepático, el virus desnudo interactúa directamente con los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) expresados en la membrana celular de los hepatocitos para unirse a la integrina $\alpha 3$ e internalizarse mediante endocitosis dependiente de clatrina y dinamina 2. Por otro lado, si el virus es cuasi envuelto la internalización se realiza por endocitosis dependiente de clatrina y dinamina 2 o mediante el tráfico de endosomas tempranos Rab5, tardíos Rab7 y eventualmente lisosomas para liberar el genoma viral en el citoplasma (Figura 4) (Kalia et al. 2009; Holla, et al., 2015).

Los HSPGs son polisacáridos que se encuentran en la membrana celular. Estos receptores tienen un papel importante en el metabolismo de lípidos, pero además pueden actuar como receptores endocíticos (Sarrazin et al., 2011).

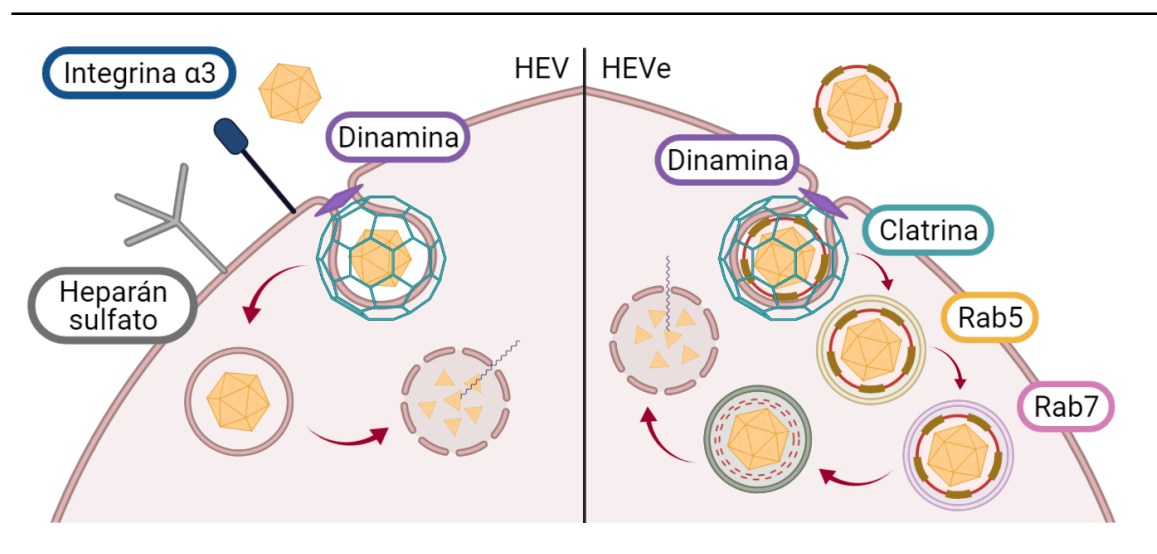


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de hepatitis E (VHE) y virus de hepatitis E cuasi-envuelto (adaptado de Oechslin et al., 2020).

Dentro de la célula se libera el ARN o genoma viral. La estructura 7-metilguanosina en el 5' NTR del genoma recluta la subunidad ribosómica 40S del huésped y una vez que se ensamblaron las subunidades del ribosoma, comienza la traducción de proteínas virales. Las NSPs se traducen a partir del ARN genómico (Yin et al., 2016).

Debido a que el ARN viral tiene un sentido positivo, este será replicado sintetizando hebras ARN en sentido negativo mediante la ARN polimerasa dependiente de ARN. La hebra de ARN negativa que fue sintetizada se vuelve un molde para hacer copias de ARN positivo. El CRE del genoma sintetizará ARN subgenómico del cual se traducirán la proORF2 y proORF3 (véase en la figura 2, B) (Cao & Meng, 2012; Ju & Ding, 2019).

Para el ensamblaje de los nuevos viriones se requiere la proORF2 para empaquetar el genoma de las partículas virales. Esta proteína tiene la capacidad de reconocer el ARN genómico que se ha replicado en el sitio de ensamblaje. Este reconocimiento se hace mediante la N terminal de proORF2 que contiene un péptido señal con un dominio rico en arginina involucrada en la encapsidación de los viriones nuevos. Alrededor de 110 aa residuales de la región N terminal interactúan con la región de 76 nt del extremo 5' del genoma. También se cree que para el ensamblaje de virus se requiere que la proteína tenga contacto con el genoma viral nuevo (Ju & Ding, 2019).

El lugar de ensamblaje aún es inexacto. En hepatitis C, se ha reportado que el virus puede inducir la acumulación de gotas lipídicas (LD), organelos celulares que funcionan como almacén de lípidos que contienen proteínas centrales responsables de señalizar el sitio para el ensamblaje. Este proceso también se supone para el caso del VHE (Cao & Meng, 2012).

Después de que la etapa de ensamblaje ha finalizado, continua la liberación de las partículas virales nuevas.

La proORF3, que no interviene en la replicación, ensamblaje o entrada, su función se asocia a la liberación de las partículas virales. Primero, la proORF3 fosforilada interactúa con la proORF2 no glucosilada para reconocer las partículas virales, después los viriones son ubicados en cuerpos multivesiculares (MVB) mediante complejos de clasificación endosomal (ESCRT), importantes para el transporte celular. Los MVB son compartimentos endosómicos basados en complejos de proteínas ESCRT (Yin et al., 2016).

La proORF3, además de interactuar con proORF2, también se encarga de relacionarse con otras proteínas de huésped como los microtúbulos en citoesqueleto y el gen de susceptibilidad tumoral 101 (Tsg101), que forma parte de ESCRT. Se ha encontrado que la región rica en prolina de ORF3 interactúa con Tsg101 para aprovecharse de la maquinaria ESCRT y poder movilizar los viriones hacia el MVB y que sean liberados (Yin et al., 2016).

Las partículas nuevas del virión del VHE, los VHEe, son las únicas que poseen membranas lipídicas asociadas con proORF3. Esta cápside está formada en base a la membrana celular y “disfrazando” los antígenos virales para evitar ser reconocido y neutralizado por los anticuerpos. Para la liberación de los VHEe, no se requiere de lisis celular, pues serán liberados mediante exocitosis y con ello, recubren con la capa lipídica de la célula al ser expulsados protegiendo al virión y su material genético. En la envoltura viral se expresará la proORF3 (Yin et al., 2016).

En la superficie de los VHEe se han detectado tetraespaninas, moléculas de adhesión celular epitelial (EpCAM), la fosfatidilserina (PS) y la proteína de red trans de Golgi 2 (TGOLN2) (Yin et al., 2016).

Los MVB se fusionan con la membrana celular para liberar los VHEe. Este mecanismo es regulado por Rab27a, gen involucrado en el proceso de tráfico de vesículas y movimiento de proteínas dentro de la célula. También se puede encontrar CD63 y CD81 en los exosomas de salida. Por otro lado, proORF3 se oligomeriza y adquiere la función de canal iónico, sin embargo, aunque no está claro su mecanismo se propone que ajusta la concentración de iones y pH del exosoma para producir un entorno que conduzca a la liberación de viriones. La proORF3 también se encuentra palmitoilado en los residuos de cisteína en la región N terminal por palmitoiltransferasa necesaria en este proceso (Yin et al., 2016).

Los viriones pueden ser liberados en la superficie apical y/o basolateral de los hepatocitos. Los que se liberan en la parte apical ingresan a la vesícula biliar, donde su contenido degrada la membrana por acción detergente, dejando el virus desnudo (figura

5). Estos se conducen hacia el sistema gastrointestinal para ser liberados al medio ambiente en las heces (Ju & Ding, 2019).

El resto de VHEe liberados también tienen la habilidad de infectar a otras células con un mecanismo diferente el cual dependerá del tráfico endocítico y su acidificación. Esto es debido a que las proteínas virales que interactúan con la célula directamente se encuentran cubiertos por la cápside (Figura 5). Cuando la célula a infectar realiza endocitosis el virus entra y la cápside es degradada en el endolisosoma exponiendo al virus para que proORF2 se una a HSPG (Yin et al., 2016).

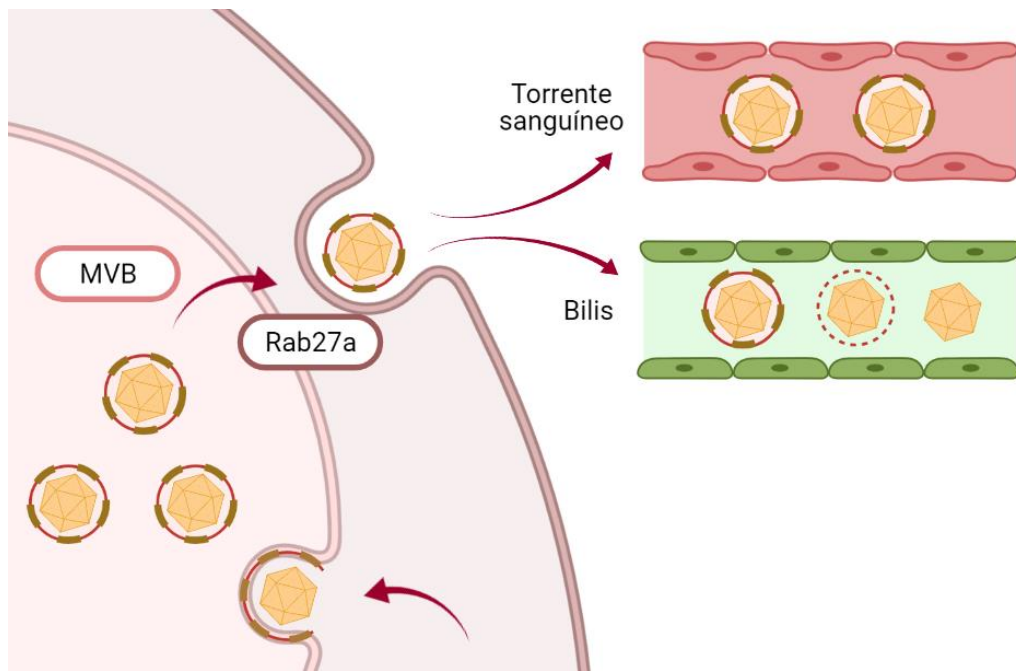


Figura 5. Liberación de viriones nuevos del VHE (tomado de Oechslin et al., 2020).

2.1.4.1. Replicación extrahepática

En los últimos años se ha estudiado la replicación extrahepática tanto en humanos como en porcinos. En los humanos, como hospederos en los cuales la infección a causa del VHE es evidente a diferencia de cualquier otro mamífero, se han asociado otros

síntomas clínicos y desarrollo de síndromes ajenos al daño hepático. Estas alteraciones extrahepáticas incluyen: desórdenes neurológicos, alteraciones hematológicas, en riñones, corazón, páncreas, sistema músculo esquelético y vascular (Cuadro 2) (Fousekis et al., 2020).

Cuadro 2. Manifestaciones clínicas extrahepáticas en humanos (Fousekis, et al., 2020)	
Sistema	Manifestaciones
Sistema neurológico	Síndrome de Guillain-Barré Encefalitis Mielitis Miositis Neuritis vestibular Neuropatía periférica Parálisis de Bell Mononeuritis multiplex Parálisis oculomotora Poliradiculoneuropatía
Sistema hematológico	Trombocitopenia Anemia hemolítica Anemia aplástica Síndrome de hemofagocitopenia
Riñones	Crioglobulinemia Glomerulonefritis
Corazón	Miocarditis
Páncreas	Pancreatitis aguda
Tiroides	Tiroiditis autoinmune Tiroiditis subaguda
Sistema esquelético	Poliartritis
Vasculitis	Purpura Henoch-Schonlein

No se tiene certeza de cuáles son los mecanismos por los cuales el virus puede producir afectaciones extrahepáticas, lo que indujo al estudio de la replicación viral en otras líneas celulares (Pischke et al., 2017).

Se han supuesto algunos posibles mecanismos basado en algunas características virales como la unión accidental del VHEe a otras membranas celulares por su similitud a los exosomas (Takahashi et al., 2010), o la inserción de secuencias en la región hipervariable para aumentar el tropismo celular pueden favorecer la infección a muchos tipos celulares (Shukla et al., 2011).

A pesar de ello, aunque se ha comprobado la presencia y replicación en otros tipos de tejidos como nódulos linfáticos, colon, intestinos, estómago, bazo, tonsilas, glándulas salivares y pulmones tanto en humanos como en porcinos, no se ha demostrado que los supuestos mecanismos antes mencionados den lugar a la replicación viral (Williams et al., 2001).

2.2. Epidemiología de la hepatitis E

Las características epidemiológicas del VHE son fundamentales para implementar estrategias para el control y prevención de la enfermedad, así como también, gestionar los riesgos de infección y transmisión. A continuación, en este apartado se hará una revisión referente a la distribución, reservorios, la enfermedad en humanos, porcinos y murinos, factores riesgo en las distintas especies, entre otros aspectos que ayudan a comprender su la epidemiología del VHE.

2.2.1. Distribución

La hepatitis E tiene una distribución amplia, principalmente en países tropicales y subtropicales. Partiendo de ello, se reconocen áreas hiperendémicas como Asia (central y sudoriental), África (norte y oeste) y México dado a que la seroprevalencia reportada llega a superar el 26%. En EE. UU., países sudamericanos, europeos y de Asia-Pacífico también se han presentado casos de hepatitis E, pero la seroprevalencia no es mayor al 25%. En estas últimas regiones, suele mantenerse entre el 1 y 5%, ya que, los casos reportados son esporádicos y asociados a viajes realizados a países endémicos. A pesar de ello, en la

actualidad la prevalencia de estos países ha aumentado, principalmente en Europa (Aspinall et al., 2017), y los turistas representan hasta un 50% de las infecciones asociadas a viajes por falta de cuidados o asesoramiento respecto al consumo de agua y alimentos en países endémicos (Nicolini et al., 2020).

A grandes rasgos, los países industrializados se ven afectados por el consumo de alimentos infectados, mientras que los países de medianos y bajos ingresos por la dificultad para sanear agua (Ruggeri et al., 2013).

Una vez aclarado esto, es importante comprender que cada genotipo del VHE tiene características específicas y tropismo por especies determinadas y aparentemente geográficas. Por lo que, la distribución de cada genotipo o subtipo alrededor del mundo es muy variada (Figura 6).

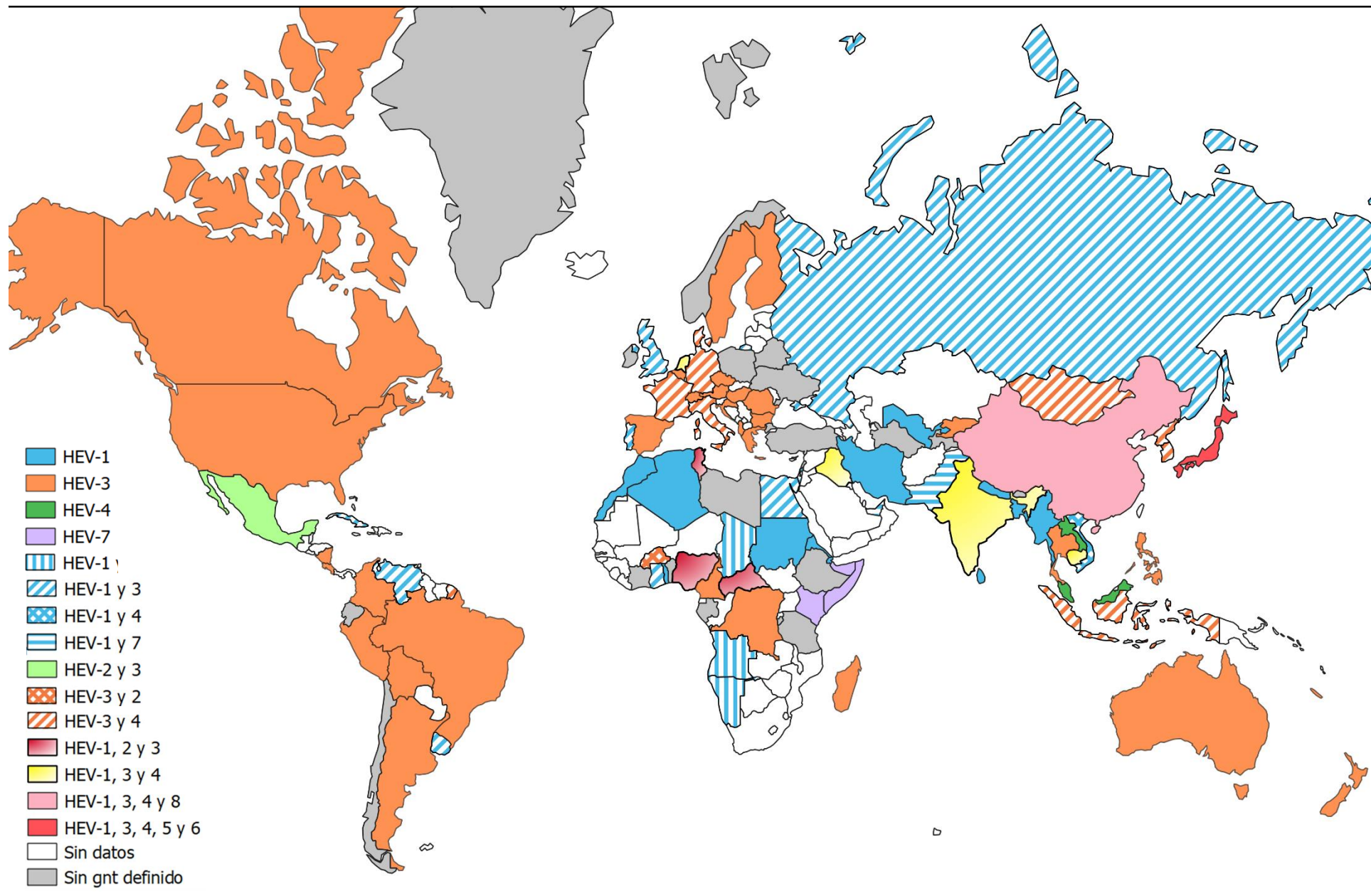


Figura 6. Distribución mundial de los genotipos del VHE (Fuente: realizado por el autor).

2.2.2. Hepatitis E en humanos

Actualmente se conoce que la población humana es susceptible a los genotipos VHE-1, VHE-2, VHE-3 y VHE-4. El resto de los genotipos continúan en investigación, ya que, aunque sólo se han detectado en animales, pero no se descarta su potencial zoonótico (Wang & Meng, 2021).

Como ya se ha mencionado, hasta ahora los genotipos VHE-1 y 2 son específicos de la especie humana. Las cualidades de su genoma definen el tropismo a hospederos determinados y con ello, se establecen las vías de transmisión. Estos aspectos ayudan a definir los factores de riesgo asociados a la enfermedad, que incluyen desde rutas de transmisión hasta hábitos que aumentan el riesgo de infección (Wang & Meng, 2021).

La Hepatitis E es una enfermedad autolimitada en la cual su sintomatología consta desde fiebre, vómitos, náuseas, ictericia, hepatomegalia hasta una insuficiencia hepática aguda que puede conducir a la muerte (Rodríguez et al., 2012).

Sin importar el genotipo adquirido tras una infección, el período de incubación es de 4 a 5 semanas en promedio, pero los registros de brotes anteriores han reportado que puede variar entre 2 a 10 semanas (Chauhan et al., 1993).

Una vez que el virus se ha movilizó al hígado comienza su replicación en los hepatocitos, se acumula en el líquido biliar y es expulsado en las heces. La viremia ocurre y puede hacerse evidente antes de que se manifiesten alteraciones hepáticas aunado a la respuesta inmune humoral (Figura 7) (Kamar et al., 2012).

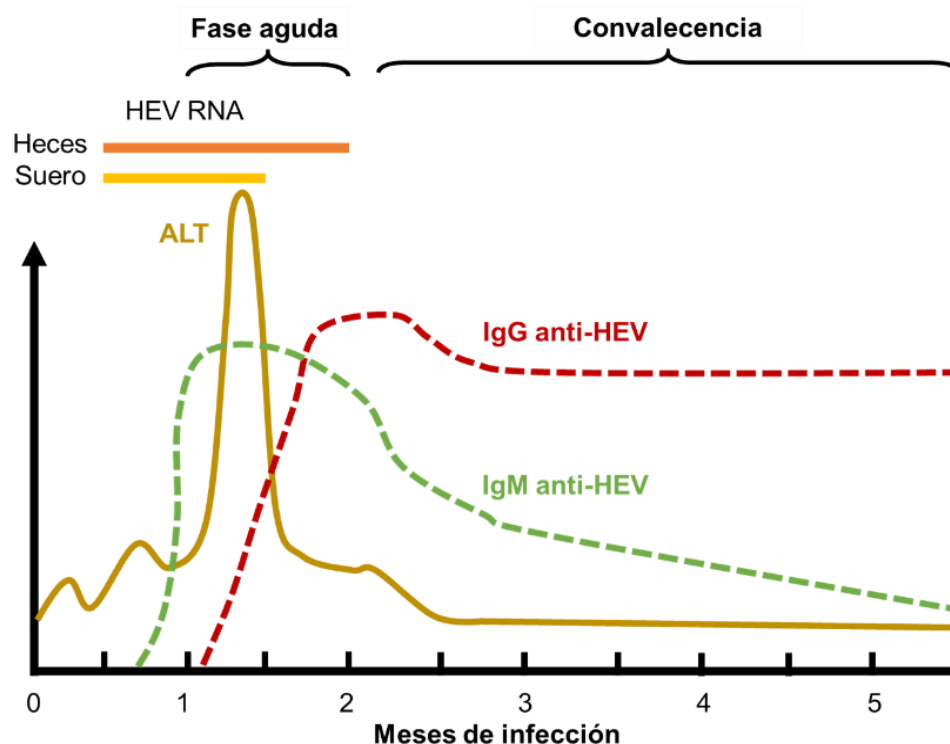


Figura 7. Esquema del curso de la infección del VHE en humanos (tomado de Krawczynski et al., 2011).

Como podemos observar, los anticuerpos IgM aparecen desde la fase inicial de la enfermedad y desaparecen en un lapso de 5 meses. Al contrario de los anticuerpos IgG, que pueden permanecer por más de 14 años posteriores a la infección (Emerson & Purcell, 2003; Aggarwal & Jameel, 2011).

2.2.2.1. Vías de transmisión

La forma de transmisión natural es mediante la vía oro-fecal, pues favorece el transporte del virus a sus células diana para su replicación. Por lo anterior, la ingesta de agua en malas condiciones sanitarias es una de las principales formas de infección, ya que el agua es un vehículo viable que puede propagar el VHE fácilmente y se ha asociado epidemias reportadas (Khuroo, 1991).

Otra forma de infección por vía oro-fecal es mediante el consumo de alimentos contaminados. El ARN viral del VHE se ha detectado principalmente en productos derivados del cerdo, y con menos frecuencia en derivados de bovinos (Vercouter et al., 2018), cabras (Long et al., 2017), jabalíes (Rivero et al., 2017), venados (Weger et al., 2017) y mariscos (Rivadulla et al., 2019).

También se han reportado otras vías de transmisión como mediante la transfusión de hemoderivados infectados, transmisión vertical (principalmente para los genotipos VHE-1 y 2) y contacto directo con sujetos infectados. La transmisión de persona a persona es muy poco común debido a la dosis infecciosa mínima para producir una enfermedad (Rodríguez et al., 2012).

Aunque existen muchas otras posibles formas de infección, aun se carece de información que avale este riesgo, principalmente para situaciones con riesgo zoonótico (Rodríguez et al., 2012).

2.2.2.2. Factores de riesgo en humanos

Como ha sido señalado previamente, la transmisión de la hepatitis E está estrechamente relacionada con la vía oro-fecal, por consiguiente, los factores de riesgo asociados a ello se resumen a continuación.

El consumo de alimentos contaminados, carne cruda o poco cocida, en especial si son derivados animales reservorios como porcinos o venados es un factor de riesgo establecido a causa de reportes de casos de individuos con antecedentes de haber consumido carne de cerdo, jabalíes o venados sin la suficiente cocción (Sooryanarian et al., 2019).

A pesar de la información que se tiene referente a las vías de transmisión, la infección en la población humana influye la economía del país y el nivel socioeconómico. En países clasificados como hiperendémicos, la infección generalmente se transmite por vía oro-fecal a causa del consumo de agua contaminada. Esto se debe a que en estas zonas

el proceso para el saneamiento del agua es deficiente y existen fuentes potenciales de contaminación del agua como, el desecho de excretas a fuentes de agua, los sistemas de alcantarillado o cuerpos de agua naturales donde habitan reservorios (Kamar et al., 2012). Por otro lado, los casos en los países industrializados son relativamente esporádicos puesto a que en su mayoría son asociados al turismo o viajes a países con alta endemia y consumo de carne contaminada (Nicolini et al. 2020; Rodríguez et al., 2012).

Uno de los factores de riesgo más importantes es la exposición ocupacional como el caso de los granjeros, veterinarios y personal de mataderos principalmente especializados en porcinos, así como también, personas dedicadas a la cacería puesto que tienen contacto con fuentes ambientales de desechos de animales domésticos y salvajes (Ruggeri et al., 2013).

2.2.2.3. Zoonosis

Meng et al. (1997) reportaron que el VHE porcino infecta a humanos. Los genotipos del VHE asociados a las infecciones zoonóticas en humanos son el 3 y 4. Las cepas del VHE-3 porcino se ha confirmado en América, Europa, Asia, Oceanía y África (Pavio et al., 2015); y el VHE-4 porcino en a China, Japón y Europa (Hazke-van der Honing et al., 2011). El ARN de los genotipos VHE-3 y 4 se han reportado en muestras de sangre, excremento y productos derivados de cerdos domésticos, jabalíes, venados, entre otros reservorios (Ferri & Vergara, 2021).

Aunque la zoonosis depende en gran medida de la vía de transmisión, esto se ve favorecido por la estabilidad natural de los viriones independientemente de la ruta de transmisión. Johne y col. (2016) reportaron que el virus puede ser infectivo hasta 28 días a temperatura ambiente en cultivos celulares.

2.2.3. Hepatitis E en animales

Las especies a las que puede infectar el VHE depende de factores tanto internos (factores virales, genoma y/o proteínas virales) como externos (medio ambiente). Los factores internos contribuyen a la determinación del rango de hospederos, por la capacidad de unirse a las células del huésped para replicarse exitosamente (Meister et al., 2019).

En el siguiente apartado se revisan las principales especies a las que el virus puede infectar según su genotipo. Además, se explicarán las vías transmisión y factores de riesgo en el porcino doméstico como principal reservorio y las ratas como un reservorio de gran importancia en la actualidad por su amplia distribución.

2.2.3.1. Especies reservorias

Los genotipos VHE-1 y VHE-2 se han adaptado específicamente a la especie humana. Aun así, el genotipo 1 se ha reportado en otras especies de primates como monos rhesus (*Macaca mulatta*), monos cynomolgus (*Macaca cynomolgus*), chimpancés (*Pan troglodytes*), monos ardilla (*Saimiri sciureus*), monos patas (*Erythrocebus patas*), monos buho oriental (*Aotus trivergatus*), titíes bigotudos (*Saguinus mystax mystax*) y monos vervet (*Chlorocebus pygerythrus*) (Kenney, 2019).

El genotipo VHE-3 es el más investigado por su cualidad zoonótica. En primera instancia, los porcinos y los primates eran las únicas especies reservorios asociadas a este genotipo (Kenney, 2019). No obstante, con el desarrollo de nuevas tecnologías y el aumento de interés para conocer su epidemiología, se encontró evidencia de infección por el VHE en animales que cohabitan con humanos en áreas urbanizadas como ratas (Lack et al., 2012), perros (*Canis lupis familiaris*) (Zeng et al., 2017); animales de importancia agrícola como ganado (Yugo et al., 2018), cabras (*Capra hircus aegagrus*) (Long et al., 2017), ovejas (*Ovis aries orientalis*) (Sarchese et al., 2019), caballos (*Equus caballus ferus*) (García et al., 2018) y conejos (*Oryctologus cuniculus*) (Abravanel et al., 2017); animales de cacería como jabalíes (*Sus scrofa*) (Di Pasquale et al., 2019), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Di Bartolo et al., 2015) y liebres (Hammerschmidt et al., 2017); e

incluso animales exóticos como mangosta de java (*Herpestes javanicus*) (Nidaira et al., 2012) y delfines mulares (*Tursiops truncatus*) (Montalvo et al., 2017).

El genotipo VHE-4 es similar al genotipo antes mencionado, pero con la diferencia de que los casos reportados hasta ahora se limitan en Asia y Europa (Forni et al., 2018). Los porcinos son reservorios primarios de los genotipos VHE-3 y 4, pero también se ha encontrado evidencia en otras especies de animales de esas regiones (Kenney, 2019).

La circulación de los genotipos VHE-5 y 6 es baja y se limita al área de Japón. Estos genotipos solo se han aislado a partir de jabalíes. A pesar de ello, no se descarta la posibilidad de que pueda infectar a humanos por lo que aún se estudia su capacidad infectiva (Takahashi et al., 2011; Kenney, 2019).

Finalmente, los genotipos VHE-7 y 8 fueron descubiertos recientemente en camellos dromedarios (*Camelus dromedaries*) y bactrianos (*Camelus bactrianus*). Se ha reportado que el genotipo 7 tiene la capacidad de infectar humanos y el genotipo 8 puede infectar macacos cynomolgus, y aunque aún hay mucho que investigar referente a estas variantes, deben ser considerados como potencialmente zoonóticos (Lee et al., 2016).

2.2.3.2. Infección del VHE en porcinos domésticos

El VHE de origen animal fue descrito por primera vez por Meng et al. (1997). El nuevo virus fue identificado en los cerdos y se encontró el ORF2 compartía un 90-92% de similitud con secuencias de aminoácidos de las cepas humanas. Estos hallazgos ayudaron a profundizar los estudios, identificando a los cerdos como reservorios e incluyendo este agente dentro de las enfermedades zoonóticas.

La infección por el VHE en porcinos ocurre naturalmente de manera asintomática. El virus es capaz de multiplicarse en grandes cantidades de manera eficiente y ser excretado en las heces, lo que hace que sea muy persistente entre las poblaciones animales (Meng et al., 1997; Pavio et al., 2015).

Existe mucha variabilidad entre los estudios epidemiológicos a cerca de la seroprevalencia del VHE en porcinos, pero se ha demostrado que se encuentra entre 46-100% en los hatos. La diferencia entre los datos se debe a las buenas prácticas de manejo (higiene, bioseguridad y condiciones de los animales), ya que esto depende del tipo de granja y sistema de producción (Pavio et al., 2010).

Muchos investigadores se han enfocado en el estudio de factores de riesgo tanto en porcinos como fuente de consumo, y en humanos con el fin de mitigar la transmisión. En cuanto a los porcinos, se ha demostrado que el sexo del lechón, la paridad de la cerda y la co-infección con otros virus puede influir en la dinámica de infección por el VHE (Salines et al., 2019), así como también, que la inmunidad pasiva o anticuerpos conferidos por la madre que retrasan la infección por el VHE durante su crecimiento (Figura 8) (Andraud et al., 2014).

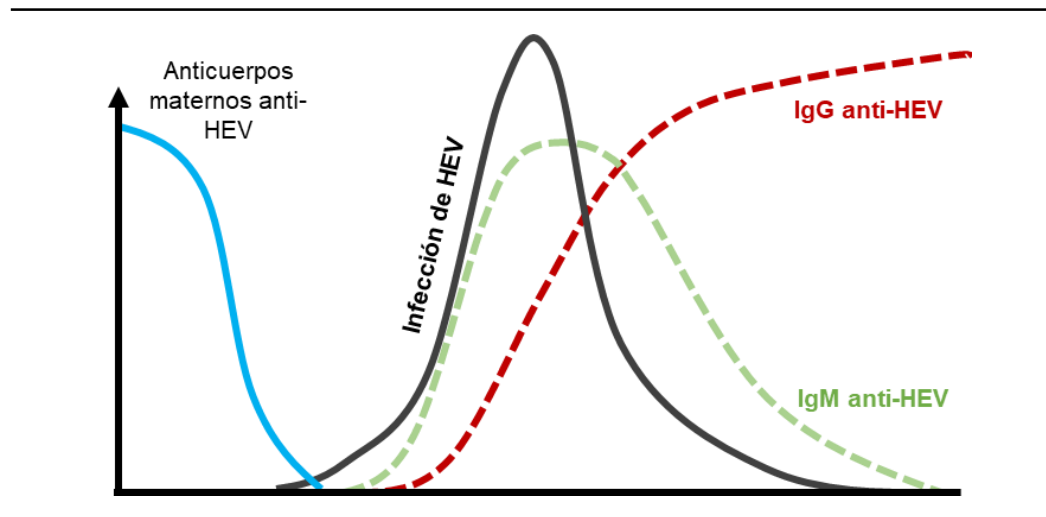


Figura 8. Curso de la infección causada por el VHE en cerdos. La mayoría de los cerdos están infectados naturalmente con VHE a la edad de 2 a 4 meses. El 86% de los cerdos están infectados naturalmente con el virus hasta la decimoctava semana. Los anticuerpos maternos disminuyen a la edad de 8 a 10 semanas. Después de su disminución, el virus podría atacar a los lechones alrededor de la segunda semana después del nacimiento. La infección por VHE porcino se acompaña de una viremia transitoria que dura de 1 a 2 semanas y una emisión fecal-oral del patógeno que continúa de 3 a 7 semanas. El número de cerdos virémicos aumenta de 9 semanas con un pico alrededor de las 15 semanas, después del descenso a la edad de sacrificio. La seroconversión de IgM anti-VHE, que está relacionada con el pico de la excreción del virus a través de las heces, es seguida por la seroconversión de IgG anti-VHE con las concentraciones más altas a la edad de 4 meses. Curiosamente, la presencia de anticuerpos no siempre asegura la ausencia del virus porque el ARN de VHE y los anticuerpos anti-VHE se encuentran juntos en los cerdos. Esto lleva a la conclusión de que estos animales son reservorios de VHE (Pérez et al., 2015).

En los países donde es reconocida la presencia del VHE y se han realizado estudios serológicos, demostraron que la mayoría de los cerdos mayores de 3 a 4 meses poseen anticuerpos VHE, así como también que, la tasa de prevalencia varía según la región geográfica o la edad de los animales. Los cerdos menores de 2 meses generalmente son seronegativos o positivos con baja prevalencia, mientras que los cerdos mayores a esa edad muestran tasas de seropositividad altas que pueden superar hasta el 80% (Ruggeri et al., 2013).

El VHE porcino puede transmitirse de manera experimental y natural por contacto directo con cerdos infectados u otros animales. El constante contacto directo entre cerdos criados en confinamiento beneficia la propagación del virus, pues los cerdos alojados en el mismo corral están expuestos a saliva, secreciones nasales, orina y heces de múltiples compañeros de corral, eventos que se realiza repetidamente todos los días.

En estudios donde se evalúan las rutas de transmisión concluyen que la ruta oro-fecal no debe ser la única involucrada (Salines et al., 2020). En la búsqueda de otras posibles vías de transmisión, se encontró que VHE porcino puede transmitirse a los lechones mediante calostro infectado (Salines et al., 2019).

Los métodos de inmunización natural y experimental en los que los porcinos, ha sido un tema ampliamente estudiado para comprender su resistencia al virus y por su uso como modelos animales.

El VHE se ha extendido a las granjas comerciales de cerdos de las cuales se estima que un gran porcentaje pueden estar infectadas. Se sabe que los cerdos cursan por la infección de manera subclínica. La transmisión del cerdo hacia los humanos ocurre generalmente cuando los animales infectados entran a la cadena alimentaria, poniendo en riesgo a los trabajadores y al consumidor. Debido a ello, se han desarrollado estrategias para minimizar la fracción de animales infecciosos en la edad del sacrificio (Backer et al., 2012).

Los porcinos, como una de las principales especies de consumo y reservorio del VHE, se ha planteado la aplicación de vacunas. La vacunación ayuda a reducir la

infectividad y susceptibilidad en los animales, así como también el período medio de transmisión del virus (Backer et al., 2012).

Recientemente se desarrolló y aprobó una vacuna de hepatitis E en cerdos, la cual, contiene la proteína proORF2 del virus de hepatitis E porcino (Vermeji et al., 2019). Sin embargo, este producto no está disponible comercialmente debido a que la industria porcina no posee interés en ella, dado que no se considera que la exposición al virus en la población humana aumenta con el consumo de porcinos crudos o poco cocidos, xenotransplantes y productos farmacéuticos derivados de cerdos (García et al., 2019).

A pesar del bajo interés y demanda sobre este producto, un estudio evaluó los tres efectos de la vacunación contra el VHE en granjas porcinas. Demostró que la vacunación a temprana edad, es decir, antes de ingresar al destete, reduce la velocidad de transmisión y aumenta la fracción infecciosa. Esto se debe a que pueden infectarse a una edad más avanzada, aumentando la prevalencia en la edad de sacrificio. Por ello, al vacunar en dos etapas (temprana y avanzada) provoca un equilibrio disminuyendo la susceptibilidad entre los animales reduciendo la fracción infecciosa. Cuando la vacunación reduce el periodo de susceptibilidad, es posible la eliminación del virus al tener una inmunidad casi completa en la granja (Backer et al., 2012).

Por otro lado, la inmunidad pasiva es el primer sistema de protección de un recién nacido frente a microorganismos tras ser expuesto al medio ambiente, el cual es transferido por la madre. En los porcinos, la virulencia puede afectar de diferente manera según la etapa de vida en que tuvieron contacto con el VHE y su exposición a anticuerpos maternos al nacimiento (Krog et al., 2019). Esta es una protección parcial que reduce las consecuencias clínicas y también es temporal, ya que, el nivel de anticuerpos maternos disminuye y sin un esquema de vacunación, los individuos se vuelven susceptibles a patógenos presentes en su entorno (Andraud et al., 2014).

Se ha demostrado que la inmunidad pasiva protege a los lechones frente a la infección por VHE. Los recién nacidos que estuvieron en contacto con el virus se adaptan y desarrollan una inmunidad activa protectora para la adultez lo que justifica la ausencia de signos clínicos. La inmunidad en la primera etapa de vida y la capacidad del cerdo para

adaptarse a la infección se ha vuelto de suma importancia por ser una estrategia que ayuda a disminuir la prevalencia de animales infectados al sacrificio y así, reducir la transmisión a humanos por consumo de alimentos de origen porcino (Andraud et al., 2014; Krog et al., 2019).

La vacunación o inmunización de los animales ayuda a erradicar o controlar enfermedades; sin embargo, tienen que ser eficientes y costeable para los productores (Andraud et al., 2014).

Aunque algunos estudios consideran el sexo, la edad y/o propósito de los cerdos en granja como factores de riesgo, no hay resultados que demuestren que algunos de estos aspectos deben ser considerados como tal. Debido a ello, los factores de riesgo han sido analizados a nivel de granja (Andraud et al., 2014).

López et al. (2018) evaluaron los factores de riesgo asociados con una mayor prevalencia de infección por VHE en distintos sistemas de producción porcina. Reportaron que los sistemas de agricultura extensiva (23.9%), ausencia de vado sanitario (33.8%), falta del período de cuarentena (20.8%), y contacto con otras especies domésticas (24.5%) favorecen la presencia y transmisión del virus. Asimismo, se demostró que los cerdos criados en granjas extensas tienen un mayor riesgo de infección por VHE que aquellos criados de manera intensiva.

2.2.3.3. Infección del VHE en murinos

Los miembros de la familia muridae pueden desempeñar un papel importante en brotes de hepatitis E y muchas más enfermedades considerando el efecto de estas especies sobre la higiene ambiental, urbanización e inocuidad alimentaria. Las ratas pueden infectarse del VHE después de tener contacto con animales infectados o aguas residuales (Kanai et al., 2012).

Las ratas portan cepas relacionadas con el VHE, pero son genéticamente distintas a los de otros mamíferos y aves. Estas se han clasificado dentro del género *Orthohepevirus*

C (Kabrane et al., 1999). En unos inicios se desconocía el potencial zoonótico de esta cepa y especie reservorio, por lo que muchos investigadores se dedicaron a estudiarlos a profundidad. Sin embargo, durante este proceso se ha evaluado la capacidad de las ratas *Rattus* spp. como reservorios del genotipo 3 del género *Orthohepevirus A*.

Un estudio reportó 28.6% (16/56) de seropositividad y un 17.9% (10/56) de positividad RT-PCR semi-anidado en ratas noriegas que fueron capturadas en los alrededores de granjas porcinas donde previamente se había confirmado la presencia del VHE en cerdos (Kanai et al., 2012).

En uno de los estudios más recientes realizado en ratas capturadas en granjas porcinas de Italia, se logró identificar un subtipo del genotipo 3 (VHE-3e) mediante análisis filogenéticos. Con ello, se comprobó que las cepas VHE-3 de cerdo y las ratas, compartieron un 99% de identidad de nucleótidos y 100% de identidad de aminoácidos (De Sabato et al., 2019).

Hasta el momento las cepas de rata (VHE-C1) se ha detectado en sujetos inmunodeprimidos e inmunocompetentes por lo que, aunque es un tema debate, se sugiere a las ratas como causantes de la transmisión. Esto cuestiona la susceptibilidad de esta especie para actuar como reservorio y su potencial de transmitir otros genotipos del virus que no están dentro del género *Orthohepevirus C* (Kamar et al., 2013).

2.3. Técnicas para la detención del VHE

El aislamiento del VHE mediante cultivos celulares siempre han sido un reto. Se han puesto a prueba distintos sistemas de cultivo celular para sus distintas cepas; sin embargo, el proceso requiere tiempo y generalmente el recuento de viriones es bajo (Fu et al., 2019).

A pesar de ello, este método ha sido útil para el aislamiento viral para profundizar estudios y probar productos farmacéuticos. Además, se ha progresado para que este método sea optimizado (Fu et al., 2019).

2.3.1. Sistemas de cultivo celulares para el estudio de la hepatitis E

Antes de que se implementaran los sistemas de cultivo celular para la propagación del VHE y comprender el ciclo de replicación, se utilizaban sistemas de expresión como mediante *Escherichia coli* o células de insectos, pero los resultados que se obtenían no eran buenos (Fu et al., 2019).

El VHE debería tener la capacidad de infectar distintas líneas celulares, aun así, cualquier sistema de cultivo que se pretenda establecer debe tener como requisito que el aislado viral primario logre infectar las líneas celulares de manera eficaz. Los primeros intentos fueron realizados por Pillot et al. (1987) con muestras de pacientes. Estas primeras pruebas demostraron que el VHE puede encontrarse de forma natural en las heces y aislarse con líneas de células hepáticas.

Posteriormente, con las cepas desarrolladas se establecieron sistemas de cultivo celular para el desarrollo de pruebas serológicas y ensayos de neutralización optimizando el procedimiento a partir de heces. Así mismo, se probaron 21 líneas celulares evidenciando que solo una línea celular de hepatoma (PLC/PRF/5) y una de cáncer de pulmón (A549) fueron eficientes para la propagación del VHE (Pillot et al., 1987; Huang et al., 1995). Estos hallazgos fueron reforzados por Tanaka y col. (2007, 2009) quienes inocularon 21 líneas celulares con extractos fecales de pacientes con hepatitis fulminante y el ARN del VHE se detectó en el sobrenadante de las células antes mencionadas. Estos sistemas de cultivo permitieron una liberación rápida de los virus progenie con una mayor título e infectividad. Posteriormente, se probaron con VHE-1, 3 y 4 en células PLC/PRF/5 y A549 (Takahashi et al., 2010).

Acorde a los resultados obtenidos en líneas celulares a partir de tejidos humanos y el amplio tropismo de especies, se continuó con el uso de líneas celulares de origen animal para analizar la patogénesis y respuestas inmunes. La primera línea celular utilizada para la propagación del VHE se hizo a partir de una mezcla de hígado de cerdo (denominado como VHE HB-1) e hisopados anales (VHE HB-2) de animales infectados con el VHE-4 para inocular células IB-RS-2 de riñón porcino obteniendo un resultado exitoso (Zhang et al., 2011).

El VHE humano también se ha inoculado en células LLC PK1 de riñón porcino (Shukla et al., 2012).

La identificación del VHE en ratas y la preocupación de esta especie como un reservorio que puede provocar zoonosis ha incitado a profundizar con estudios en cultivos celulares para su propagación. Las células de PLC/PRF/5, Huh-7, HepG2 y A549 son adecuados para los genotipos de rata para la detección de ARN (Li et al., 2015; Jirintai et al., 2014).

2.3.2. Modelos animales para su estudio

El modelo animal ideal para la infección del VHE debe ser capaz de diseminar el virus en heces, producir anticuerpos anti-VHE, tener niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) sérica, ARN viral detectable en el hígado y tejido extrahepático, alta mortalidad durante preñez, infección persistente si hay inmunosupresión y susceptibilidad a las cepas humanas del virus (Li & Wakita, 2018).

2.4. Estado actual de la hepatitis E en México

Según el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Hepatitis Virales de la Dirección General de Epidemiología (DGE, 2012) se reconoce que en nuestro país no se cuenta con información confiable para la caracterización de este tipo de padecimientos. A causa de ello, existe muy poca información acerca de la prevalencia y la Secretaría de Salud considera necesario fortalecer acciones de vigilancia con procedimientos específicos para la detección, notificación, seguimiento y clasificación de los casos.

Estas instituciones clasifican la hepatitis D y E como “Otras hepatitis víricas” en los reportes semanales de vigilancia epidemiológica. El diagnóstico de la Hepatitis E consiste en la exclusión de las otras etiologías de hepatitis, en especial la Hepatitis A por análisis serológicos. Los casos de hepatitis E no son reportados por la Secretaría de salud,

ya que solo se observan alrededor de 12% de casos de hepatitis de etiología desconocida (InDRE, 2017).

Un dato curioso que resaltar, el cual confirma la necesidad de esclarecer la información obtenida en las instituciones de salud, es que, en la información más reciente acerca de las hepatitis víricas, el virus de la hepatitis E está clasificado en la familia *Caliciviridae* en lugar de *Hepeviridae* (InDRE, 2017).

La primera vez que se detectó el VHE en México fue a causa de un brote entre 1986 y 1987, logrando la identificación el genotipo 2 a partir de las muestras de los casos reportados. A partir de ello, México se reconoció como una zona hiperendémica y la cepa se volvió propia del país. No obstante, desde la primera detección no se tienen reportes actualizados referentes al VHE-2 (Realpe et al., 2018).

En el 2005, Cooper y colaboradores reportaron por primera vez la presencia del genotipo 3 del VHE en los estados de Sonora, Sinaloa y Puebla en excremento de cerdos y encontró un 81% de seropositividad, con lo que aumentó la preocupación de tener esta problemática como agente zoonótico e impulsó algunos investigadores para aportar información y comprender la epidemiología del virus. Más tarde se detectó el VHE-3 en un 19.5% de hígados de cerdos para consumo humano provenientes de rastros de Tipo Inspección Federal y centros de venta del Estado de Nuevo León (Cantú et al., 2013). También se ha reportado hasta un 31% de cerdos seropositivos en 9 estados céntricos del país: Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Ciudad de México, Morelos, San Luis Potosí, Querétaro, Veracruz y Puebla (Merino et al., 2016) y en un estudio más grande, donde se muestrearon 27 estados de la república, se encontró un 87% de cerdos seropositivos (García et al., 2017).

La mayoría de la información referente al genotipo 3 publicada hasta el momento se ha enfocado al estudio de la especie porcina. La única especie que se ha reportado positivo al VHE dentro del país es el venado cola blanca (Medrano et al., 2012).

Los estudios de seroprevalencia que se han realizado en humanos están enfocados a posibles grupos de riesgo en áreas rurales (Alvarado et al., 2014) o comunidades

específicas (Alvarado et al., 2019; Alvarado et al., 2015). Además, no se especifica el genotipo circulante, lo cual es fundamental para entender la epidemiología de la infección.

Los estudios intersectoriales son importantes para comprender la epidemiología del VHE, por lo que ha sido introducido el concepto de Una Salud. En el 2017 se estableció HEVnet, una base de datos con el fin de recopilar y compartir la información de sectores de salud, veterinaria, alimentos, medio ambiente y seguridad sanguínea de nueve países a enero del 2019. Un 89% de la información presentada en la plataforma es de humanos, mientras que lo referente a secuencias animales, origen alimentario y medio ambiente es menor al 6% haciendo evidente las áreas que se necesitan abordar para estudiar la distribución, epidemiología molecular, interacción reservorios, evolución y aspectos que ayuden a la clínica (Mulder et al., 2019).

En Latinoamérica se cree que se subestima la morbilidad, ya que los datos epidemiológicos informan una baja incidencia en humanos, aunque los datos serológicos muestran una alta proporción de infecciones subclínicas. Se carece de un diagnóstico preciso y el manejo del paciente, así como también de pruebas específicas accesibles (Sarmiento & Arenas, 2019).

En México se ha recomendado:

- El uso de pruebas de ácidos nucleicos para detectar ARN para estandarizar la detección del VHE con los estándares disponibles a nivel mundial;
- Estudiar la variabilidad genómica del virus en distintas poblaciones para identificar la verdadera población de riesgo;
- Analizar origen y transmisión de las infecciones por el VHE con estudios sistemáticos en áreas con mal saneamiento de agua;
- Evaluar bancos de sangre y;
- Promover la enfermedad a profesionales de la salud e incrementar el flujo de información relacionada a factores de riesgo.

(Realpe et al., 2018).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de trabajo

El procesamiento de las muestras de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.2. Área y características del territorio de estudio

La presente investigación se realizó en diversas unidades de producción y proceso porcino de los Estados de Nuevo León y Coahuila de Zaragoza, México. El Estado de Nuevo León colinda al norte con el lado noreste del estado de Coahuila y ambos se encuentran al noreste del país.

La porcicultura es practicada en todo el país; sin embargo, un 50% del total de la producción de carne de cerdo a nivel nacional es aportado por los Estados de Jalisco, Sonora y Puebla. Referente a los Estados incluidos en este estudio, según la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA, 2009), aunque la porcicultura en Nuevo León aún está en crecimiento contribuye a nivel nacional. Los municipios con mayor producción de toneladas han sido Apodaca, Cadereyta Jiménez, Doctor González, General Terán, General Zuazua, Montemorelos, Pesquería y Salinas Victoria (SAGARPA, 2009). Por otro lado, el estado de Coahuila también aporta a la producción porcícola del país, pero al igual que Nuevo León, su aporte es menor a diferencia de otros estados (SENASICA, 2017).

3.3. Colecta de muestras

El muestreo se realizó en un periodo de agosto 2019 a junio 2021. En cada unidad de producción se obtuvieron muestras de trabajadores que laboraban dentro de la unidad,

de porcinos y ratas en caso de su presencia en la granja. Cada muestra fue obtenida y transportada en refrigeración y almacenada según sus requerimientos para preservarlas (véase en los apartados 3.3.2., 3.3.3. y 3.3.4.).

3.3.1. Tamaño de muestra

Debido a que se desconocía la cantidad de granjas porcinas, sistemas de producción y estructura en el noreste de México, se entrevistó a productores y comercializadores de productos veterinarios para obtener un estimado de la cantidad de granjas en esta zona del país. Igualmente, no se tenían cifras oficiales o actualizadas de la cantidad de personas dedicadas y laborando en esta actividad y se desconocía el tamaño de la población de roedores en relación con cada tipo de unidad de producción.

El tamaño de muestra para detectar un individuo positivo (portador de secuencias genéticas del virus o de anticuerpos) por unidad de producción, se calculó considerando un muestreo simple. Se identificaron 19 unidades de riesgo, dentro de las cuales se muestrearon entre 5-10 cerdos, 1-2 roedores y al menos 1 trabajador por cada unidad. Para el cálculo de tamaño de muestra se consideró una prevalencia esperada del 20% a nivel de granja y por especies, y un nivel de confianza del 95%. Los criterios estadísticos y cálculos se realizaron acorde a lo señalado en el programa EpiMuestra versión 1.0 (Segura, 2008).

3.3.2. Muestreo en humanos

La colecta de muestras al personal (trabajadores, porcicultores o médicos veterinarios) de cada unidad de riesgo fue voluntaria. Se incluyeron los individuos que han laborado en, y/o mantenido contacto con cerdos cuando menos durante 3 años en cada unidad. Para esta población sólo se requirieron muestras de sangre para la obtención de suero.

Este procedimiento de obtención de sangre fue realizado por personal especializado en enfermería y previo a ello, cada persona firmó una carta de

consentimiento informado (Anexo 1) en donde explicaba los objetivos del proyecto, el procedimiento a realizar y el seguimiento de las muestras. Los datos se manejaron de forma confidencial.

Las muestras de sangre se colectaron en tubos Vacutainer® con activador de coagulación para posteriormente centrifugar las muestras a 3,750 g por 15 minutos para recoger el suero y almacenarlo en microtubos a -20 °C.

3.3.3. Muestreo en porcinos

Las muestras a colectadas en porcinos fueron de sangre, excremento y, de ser posible, tejido hepático. Los cerdos se seleccionaron de manera aleatoria con el criterio de que fueran mayores a 4 meses de edad.

Las muestras de sangre se colectaron en tubos Vacutainer® con partículas de sílice para activar la coagulación y un polímero de gel. Esto último ayuda a separar el paquete celular del suero al centrifugar. Las condiciones de centrifugado y almacenamiento fueron las descritas para el muestreo en humanos.

Las muestras de excremento se colectaron en bolsas y se congelaron a -20 °C para su procesamiento y almacenamiento.

3.3.4. Muestreo en murinos

Para el caso de las ratas, primeramente, se identificó la presencia de esta especie dentro de la unidad, ya sea mediante entrevista al personal para su visualización y/o a través de la detección de evidencia de actividad de este animal (excretas, nidos, entre otros rastros) y posteriormente se procedió a la colocación de trampas tipo Sherman en puntos críticos (corrales y canaletas cerca de los cerdos). Una vez que los especímenes fueron capturados, se identificó la especie.

Posteriormente, los ejemplares capturados fueron colocados en frascos para proceder con la sedación mediante el uso de éter para la obtención de muestra sanguínea de acuerdo a las indicaciones de la norma mexicana NOM-026-ZOO-1999.

Una vez que se concluyó con la extracción de sangre, se continuó con la eutanasia mediante anestesia disociativa como indica la misma norma. Se realizó necropsia de cada espécimen para la obtención de tejido hepático e intestino grueso.

La muestra de sangre se almacenó en tubos Vacutainer® para obtener suero centrifugando las muestras a 3,750 g por 15 minutos y los tejidos se colocaron en tubos cónicos de 15 ml. Todas las muestras se almacenaron en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

3.4. Detección de anticuerpos contra el VHE

Los sueros humanos se procesaron mediante el kit comercial de ELISA Recombine HEV IgG/IgM (Mikrogen Diagnostik, Alemania) para determinar la presencia de IgG contra el VHE. El kit consiste en tiras de membrana de nitrocelulosa con antígenos recombinantes del VHE O2N (genotipo 1 y 3), O2C (genotipo 1 y 3), O2M (genotipo 1) y O3 (genotipo 1 y 3) fijados y purificados. Acorde al fabricante la prueba para la detección de anticuerpos IgG, tiene una sensibilidad del 96.6% y una especificidad del 97.1%.

Por otro lado, los sueros de porcinos y ratas fueron sometidos al kit ID Screen® HEV Indirect Multi-species (IDvet innovative diagnostics, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante para la detección de anticuerpos IgG contra el VHE mediante una proteína recombinante del genotipo 3.

3.5. Encuestas para asociar factores de predisposición con la seropositividad.

Los trabajadores fueron entrevistados para analizar factores de exposición. La encuesta incluía preguntas acerca de su trabajo, medidas de seguridad dentro de su trabajo,

hábitos de higiene, consumo de alimentos y antecedentes de sintomatología asociada a enfermedades hepáticas. Aunado a esto, se recopilaron datos sobre las características de manejo y bioseguridad de la unidad de riesgo.

Los datos fueron analizados mediante pruebas de χ^2 , la cual se consideró significativa si $p \leq 0.05$.

3.6. Cultivo celular para el aislamiento del VHE

Se cultivaron células de carcinoma de pulmón humano A549 a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂ en medio de mantenimiento Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, 10% de suero fetal bovino, 10,000 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de amfotericina B).

Las muestras de excremento porcino fueron utilizadas para este procedimiento, por lo cual, se realizaron extractos a partir de estas. Se realizaron pools de 3 muestras en tubos cónicos de 15 ml, recolectando 1 g de cada una para ser homogenizadas con 7 ml de Tris HCL al .01 M. Una vez que el contenido fue unificado, se centrifugó a 1,600 g por 30 min a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante claro y nuevamente se centrifugó a máxima velocidad ($\geq 16,000$ g) por 10 min.

Previo a la inoculación celular, los extractos fueron filtrados con membranas de polietersulfona (PES) con un diámetro de poro 0.45 µm (Millipore Bedford, EE.UU.). Los extractos se diluyeron 1:4 en tampón fosfato (PBS) estéril al 0.3% de albumina de suero bovino.

Se realizaron inoculaciones por duplicado. Las células A549 se cultivaron en cajas para cultivo celular de 70 mm y cajas de 24 pozos. Una vez que las células se observaron un 95-100% de confluencia, las que se encontraban en cajas de 70 mm se inocularon con 1 ml de la dilución previa y las cultivadas en cajas de 24 pozos con 100 µl.

Las células se evaluaron diariamente para evaluar efectos citopáticos. Los pasajes se realizaron cada 5 días. En cada pasaje se realizó 1:2, una parte para continuar con el

método y otra para la fijación de la monocapa. Además, se recolectó el sobrenadante para su almacenamiento y procesamiento con la técnica de RT-PCR semi-anidada.

3.7. Detección del VHE mediante RT-PCR semi-anidado

3.7.1. Extracción y cuantificación de muestras

La extracción de ARN se realizó mediante TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, EE. UU.), siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes según el tipo de muestra a procesar, ya que cada tipo de muestra requiere una preparación específica para extraer el ARN eficientemente. Posterior a esto, se continuó con el mismo protocolo el cual consiste en: agregar 0.2 ml de cloroformo para la separación de las fases acuosa, intermedia y orgánica. La suspensión se agita nuevamente por 15 segundos y se deja reposar de 2-15 minutos a temperatura ambiente.

Una vez finalizado este periodo, se centrifuga la muestra a 12,000 g durante 15 min a 2-8 °C. esto ayudara a la observación de la fase orgánica (que contiene proteína), la interfase (que contiene DNA) y la fase acuosa incolora (que contiene ARN). El aislamiento del ARN se realiza transfiriendo la fase acuosa a un microtubo a la cual se le añade 0.5 ml de isopropanol. Se mezcla suavemente y se centrifuga a 12,000 g durante 8 minutos a 4–25 °C.

Posterior al centrifugado, se formará un sedimento o pellet que corresponde al ARN. El sedimento se lava con 1 ml de etanol al 75% y se centrifuga a 7,500 g por 5 minutos. El etanol es desechado y los microtubos se colocan sobre papel secante. Una vez que el etanol se volatilizo en su mayoría, se resuspendió el pellet en 30 µl de agua libre de nucleasas para conservarlo a -20 °C.

Al finalizar la extracción de ARN, se determinó la pureza y cuantificó el material genético obtenido en las muestras con la ayuda del espectrofotómetro de microplaca

Epoch (Biotek instruments, EE. UU.) y el software Gen5™ Microplate Reader (Biotek instruments, EE. UU.).

3.7.1.1. Extracción de ARN a partir de sueros humanos y sobrenadante de cultivos celulares

La preparación de las muestras de sueros humanos y los sobrenadantes de cultivos células se realizó según el protocolo de fluido biológico indicado por el fabricante que consiste en mezclar 750 µl de TRI Reagent con 250 µl de la muestra, se homogeniza y deja reposar por 5 min para continuar con la separación de las fases con el protocolo antes mencionado.

3.7.1.2. Extracción de ARN a partir de excremento porcino

Se realizaron pool de 19 granjas con 3 muestras aleatorias de excremento porcino en tubos cónicos de 15 ml. Se recolectó 1 g de cada una para ser homogenizadas con 7 ml de Tris HCL al .01 M. Una vez que el contenido fue unificado, se centrifugó a 1,600 g por 30 min a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante claro y nuevamente se centrifugó a máxima velocidad ($\geq 16,000$ g) por 10 min.

3.7.1.3. Extracción de ARN a partir de tejido hepático de ratas

Para la extracción de ARN en las muestras de tejido hepático se prepararon siguiendo el protocolo indicado para tejidos con ligeras modificaciones. Se pesaron de 50-100 mg de tejido con material esterilizado. El tejido a procesar se colocó en un mortero previamente esterilizado para macerado con 1 ml de TRI Reagent hasta homogenizar la muestra por completo. Posteriormente se vortexeó y se dejó reposar por 5 min para continuar con la separación de las fases con el protocolo establecido por los fabricantes.

3.7.2. Detección del VHE por RT-PCR semi-anidado

La detección de secuencias genéticas del VHE se realizó con la técnica de RT-PCR semi-anidada con el protocolo descrito por Martin y col. (2007) con algunas modificaciones. Se utilizaron oligonucleótidos que se unen a regiones altamente conservadas dentro del ORF2, gen que codifica para la proteína de la cápside del VHE (Cuadro 3).

Cuadro 3. Primers utilizados para el método de RT-PCR semi-anidado (Martin et al., 2007)	
RT-PCR	
VHE-F1	5' -TTVGGGCTYCTYGACTTTGC-3'
VHE-R1	5' -CCRCCRAGAAGYGTATCAGC-3'
PCR semi-anidado	
VHE-F1	5' -TTVGGGCTYCTYGACTTTGC-3'
VHE-R2	5' -CCRCGRCCCACCTCACCAAC-3'

Dónde: V = A, C o G; Y= C o T; R= A o G.

La síntesis de cDNA mediante la RT-PCR se realizó en una etapa con el kit comercial *SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, www.lifetechnologies.com) siguiendo las indicaciones del fabricante y las temperaturas establecidas por Martin y col. (2007) (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4. Componentes de la reacción para la RT-PCR

Reactivo	Cantidad
Buffer 2 Rxn Mix	12.5 µl
5mM Mg Sulfate	1 µl
SS II RT/ Platinum™ <i>Taq</i> Mix	.5 µl
Agua libre de nucleasas	X µl
Primer forward	1 µl
Primers reverse	1 µl
RNA	X µl
Volumen total	25 µl

*El agua se ajustó en base a la cantidad de µl de ARN añadidos por la concentración requerida para kit *SuperScript*™ y cumplir con el volumen total.

Cuadro 5. Protocolo y condiciones de temperatura de la técnica del RT-PCR

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 °C	5 min	1
Fase de enfriamiento	4 °C	4 min	1
Síntesis de cDNA	48 °C	35 min	1
Inactivación de RT polimerasa	94 °C	4 min	1
Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)			
Desnaturalización	94 °C	50 seg	35
Alineación	48 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	7 min	1

Una vez que se finalizó con el RT-PCR se continuó con la PCR semi-anidada. Para ello, se utilizó el reactivo *PCR SuperMix* (Invitrogen, www.lifetechnologies.com) siguiendo las indicaciones del fabricante (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Componentes de la reacción para la PCR semi-anidada	
Reactivo	Cantidad
PCR <i>SuperMix</i>	21 µl
Primer forward	.5 µl
Primer reverse	.5 µl
RNA	3 µl
Volumen total	25 µl

Cuadro 7. Protocolo y condiciones de temperatura de la técnica de PCR semi-anidada			
Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	50 seg	35
Alineación	48 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	7 min	1

3.8. Electroforesis de los productos amplificados

Los productos amplificados resultado de la RT-PCR semi-anidado de cada muestra se procesaron para visualizar el tamaño de los fragmentos mediante electroforesis. Para ello, se realizó un gel de agarosa al 2% diluido en buffer SB 1X (Brody & Kern, 2004). Para la colocación de las muestras en cada pocillo del gel, 3 µl de cada una fue mezclado con 3 µl de 6X azul de bromofenol (25 mg de azul de bromofenol, 3 ml glicerol aforado a 10 ml con agua destilada) y 3 µl de 3X GelRed (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X, dilución 1:3,300 en 0.1 M NaCl, Biotium) (Huang et al., 2010). El procedimiento de las muestras se repitió para el marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder, Genscript).

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis a 120 voltios por 90 min. Posterior a este procedimiento, el gel fue observado en el transiluminador y se capturaron las imágenes por un fotodocumentador.

3.9. Purificación del cDNA

Los productos amplificados se procesaron a electroforesis en geles de agarosa al 1% para purificarlos con ayuda del kit comercial *E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit* (Omega Bio-Tek, www.omegabiotek.com).

El protocolo indicado por el fabricante sufrió de algunas modificaciones para asegurar la concentración requerida para su secuenciación. Por ello, el protocolo consistió en realizar electroforesis en gel de agarosa 1 % para separar los fragmentos de DNA. Una vez que las bandas fueron separadas, la banda de interés fue recortada con un bisturí. La rodaja del gel se introdujo en un microtubo de 1.5 ml y se determinó el volumen del gel. Cuando se estableció el peso de la rodaja de gel, se agregó un volumen del tampón de unión XP2 para disolver la agarosa incubándolo a 60 °C por 10 min y agitando cada 3 min. La mezcla ya disuelta fue filtrada con centrifugación a 10,000 g durante un min a través de columnas en microtubos de 2 ml para eliminar los residuos. Este proceso dejará los ácidos nucleicos de interés dentro del filtro de la columna el cual será lavado 2 veces

con el tampón SPW a base de etanol al 100%. Se centrifuga a máxima velocidad por 1 min.

Después la columna es centrifugada por 2 min a máxima velocidad para secar la matriz de la columna. Posterior al secado, se le añadió a la columna 7 µl de agua libre de nucleasas y para hacer más eficiente la liberación del DNA, se colocó en baño maría a 60 °C por 5 min y se centrifugó a 13,000 g durante 2 min. Finalmente, se continúa agregando a la columna 8 µl de agua libre de nucleasas y se repite el proceso de baño maría y centrifugado. Con este procedimiento se obtuvo un volumen bajo de 15 µl con una mayor concentración. El producto final puede almacenarse a -20 °C.

Para verificar la pureza del fragmento aislado, se realizó electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% con 3 µl del producto purificado para verificar la presencia de una banda única, y se cuantifico mediante un espectrofotómetro a 260/280 nm.

3.10. Secuenciación muestras y análisis

Los fragmentos de DNA purificados se adaptaron a los requerimientos solicitados por la empresa Macrogen, (Maryland, EE. UU.) para su secuenciación. La concentración para un producto de 212 pb fue de entre 10-20 ng/µl a un volumen de 10 µl por reacción.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación. Se analizaron los electroferogramas para la edición mediante el programa EditSeq Pro del Software ADNstar versión 15 y obtener la secuencia consenso.

La secuencia consenso se introdujo en el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) para comparar la similitud de la secuencia con otras en la base de datos.

4. RESULTADOS

4.1. Colecta de muestras y procesamiento

Se colectaron las muestras requeridas para esta investigación en un total de 19 unidades de riesgo porcino entre los Estados de Nuevo León y Coahuila de Zaragoza. Uno de los principales obstáculos para esta etapa fue el acceso a las unidades de producción, ya que, en su mayoría poseen un reglamento específico de bioseguridad, el cual prohíbe el acceso de visitantes o personal ajeno a la unidad.

Las unidades de riesgo se clasificaron como granjas tecnificadas, granjas de traspatio y rastros porcinos. El muestreo incluyó 12 granjas tecnificadas, 5 granjas de traspatio y 2 rastros porcinos distribuidas entre los dos Estados seleccionados (Figura 9).

Las unidades del Estado de Nuevo León se ubicaban en los municipios de Cadereyta Jiménez, Dr. González, Marín, Salinas Victoria, General Zuazua Santiago e Hidalgo. Los municipios muestreados para el Estado de Coahuila fueron Monclova y Frontera.

En cada unidad se obtuvieron las muestras estimadas y requeridas para el estudio, obteniendo un total de 25 muestras de trabajadores, 128 de porcinos y 13 de ratas.

Se colectaron 128 muestras de sueros y excremento proveniente de cerdos, y 37 del hígado de esos. Los cerdos muestreados sólo provenían de áreas de engorda y gestación por lo que las edades se encontraron entre 6 meses hasta 3 años. Así mismo, las razas de los cerdos incluidos fueron Yorkshire, Duroc, Hampshire, Pietrain, Landrace, y York-Landrace.

También, se identificó la especie de las ratas capturadas en las unidades de riesgo, por lo que todas correspondían a la especie *Rattus norvegicus*.

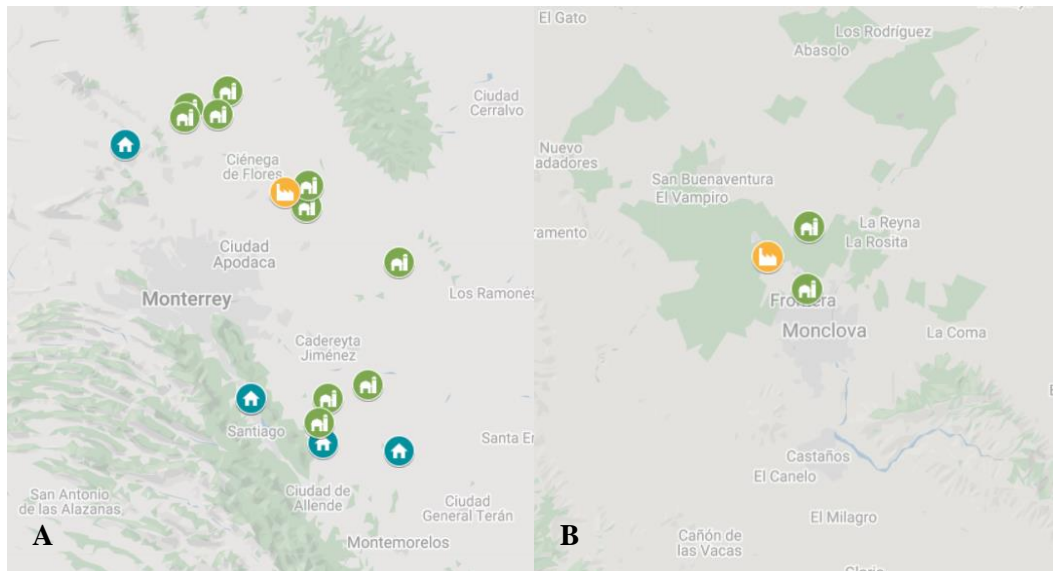


Figura 9. Distribución de las unidades de riesgo porcino muestreadas. Icono verde: representa a las granjas tecnificadas; icono azul a las granjas de traspato; icono amarillo a los rastros porcinos. A) Distribución de unidades en el estado de Nuevo León; B) Distribución de unidades en el estado de Coahuila de Zaragoza.

4.2. Detección de anticuerpos contra el VHE

4.2.1. Serología en muestras humanas

Se recolectaron 25 muestras provenientes de humanos. Con base en la clasificación de las unidades de riesgo, un 64% (16/25) correspondieron a granjas tecnificadas, un 20% (5/25) granjas de traspato y un 16% (4/25) de rastros porcinos. En cuanto a los oficios de los individuos muestreados, éstos se clasificaron en trabajadores de granjas porcinas, personal de mataderos, veterinarios y criadores de cerdos (Figura 10).

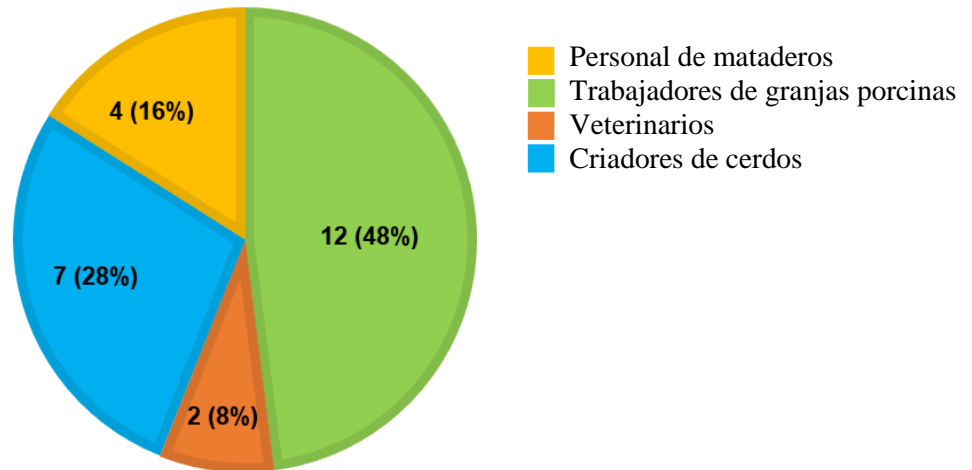


Figura 10. Proporción de los oficios del total de individuos muestreados.

Un total de 25 sueros fueron analizados; 20 de ellos con el estuche comercial de ELISA Recomline HEV IgG/IgM (Mikrogen Diagnostik, Alemania). Tras realizar las pruebas serológicas con el estuche comercial de ID Screen® HEV Indirect Multi-species (IDvet innovative diagnostics, Francia) en porcinos, los 25 sueros de humanos también se incluyeron en estas pruebas, obteniendo una 100% de concordancia con los resultados en las muestras ya procesadas y obteniendo resultados de las 5 muestras restantes.

Se estimó un 20% (5/20) de seropositividad a anticuerpos IgG anti- VHE, específicos para el genotipo 3 (Cuadro 8). Por otro lado, considerando los criterios del estuche comercial Recomline HEV IgG/IgM (Mikrogen Diagnostik, Alemania), todas las muestras fueron negativas al genotipo 1, aunque 2 fueron sospechosas.

Cuadro 8. Muestras de humanos obtenidas por municipio			
Estado	Municipio	No. de muestras obtenidas	Muestras positivas
Nuevo León	Dr. González	1	0
Nuevo León	Cadereyta Jiménez	9	2
Nuevo León	Marín	3	1
Nuevo León	Hidalgo	1	0
Nuevo León	Santiago	2	0
Nuevo León	Salinas Victoria	2	0
Nuevo León	Zuazua	2	0
Coahuila	Monclova	3	1
Coahuila	La frontera	2	1
Total		25	5 (20%)

4.2.2. Serología en porcinos y murinos

Tras procesar las muestras de los 128 porcinos se encontró una seropositividad del 49% (63/128) a anticuerpos contra el VHE (Figura 11).

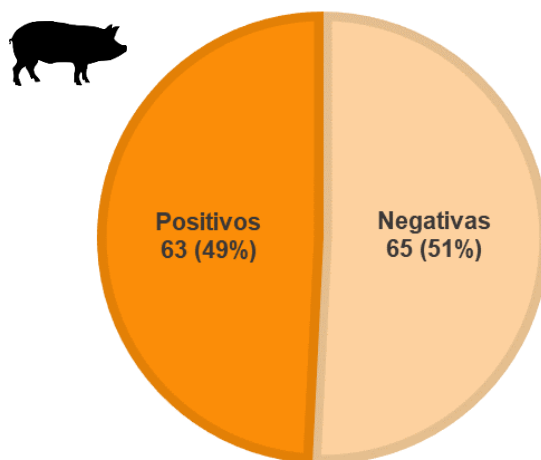


Figura 11. Proporción de cerdos seropositivos a anticuerpos IgG contra el VHE.

En cuanto a los sueros provenientes de ratas (*Rattus norvegicus*), se procesaron 13 muestras de suero, sin embargo, resultaron negativas.

4.2.3. Resultados de serología a nivel de unidad de riesgo

A nivel de granja o unidad de riesgo, un 68% (13/19) resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra el VHE. De éstas, un 77% (10/13) correspondieron al Estado de Nuevo León y un 23% (3/13) al Estado de Coahuila de Zaragoza.

En Nuevo León, los trabajadores seropositivos (60%, 3/5) correspondieron a las granjas tecnificadas. En cuanto a los porcinos, 57/63 fueron positivos, de los cuales: 20 eran del área de gestación y 37 animales del área de engorda. De los animales de engorda, 24 fueron de granjas tecnificadas, 6 de granjas de traspato y 7 de rastros porcinos. Englobando el muestreo de todas las unidades del Estado de Nuevo León, 3 resultaron seropositivas tanto en humanos como en porcinos.

En Coahuila, los trabajadores seropositivos (40%, 2/5), correspondieron a granjas tecnificadas y rastros porcinos. En cuanto a la población porcina muestreada 6/63 fueron seropositivos, de los cuales tres eran provenientes del área de gestación y 3 de engorda, ambos de granjas tecnificadas. Según los resultados, una unidad correspondiente a una granja tecnificada fue positiva tanto en humanos como en porcinos.

4.3. Asociación de seropositividad con factores de predisposición.

De las variables obtenidas a partir de las encuestas realizadas a los trabajadores no obtuvieron factores predisponentes asociados a la seropositividad.

Las variables asociadas a la presencia del VHE en la unidad de riesgo fueron: el contacto de los cerdos con otros animales, falta del equipo completo de bioseguridad y falta de desinfección de vehículos visitantes (Cuadro 9).

Cuadro 9. Variables asociadas a la seropositividad del VHE

Los cerdos tienen contacto con otros animales		Sin desinfección de vehículos visitantes		Sin uso de equipo completo de bioseguridad	
χ^2	8.895 ^a	χ^2	4.263 ^a	χ^2	8.895 ^a
gl	1	gl	1	gl	1
Sig. asintótica	.003	Sig. asintótica	.039	Sig. asintótica	.003

a. 0 casillas (0.0%) tuvieron frecuencias menores que 5. La frecuencia mínima de casilla esperada fue 9.5.

Por otro lado, las variables asociadas a la ausencia del VHE fueron: unidades de sistema intensivo, cuarentena de animales, uso de tapete sanitario para ingresar a la unidad, limpieza de corrales antes y después de ingresar animales y el uso de guantes (Cuadro 10).

Cuadro 10. Variables asociadas a la ausencia del VHE

Unidades de sistema intensivo		Cuarentena de animales		Uso de tapete sanitario para ingresar a la unidad		Limpieza de corrales antes y después de ingresar animales		Uso de guantes	
χ^2	6.368 ^a	χ^2	8.895 ^a	χ^2	8.895 ^a	χ^2	11.842 ^a	χ^2	6.368 ^a
gl	1	gl	1	gl	1	gl	1	gl	1
Sig. asintótica	.012	Sig. asintótica	.003	Sig. asintótica	.003	Sig. asintótica	.001	Sig. asintótica	.012

a. 0 casillas (0.0%) tuvieron frecuencias menores que 5. La frecuencia mínima de casilla esperada fue 9.5.

4.4. Cultivo celular para el aislamiento del VHE

Las células A549 fueron inoculadas exitosamente excepto para el caso de una muestra, pues las células fueron observadas a las 24 horas a través del microscopio inverso para ser evaluadas. Solo una muestra fue descartada debido a que ya no se encontraba viable por muerte celular. En los demás cultivos, no se observaron cambios o anomalías morfológicas, por lo que se continuó con el proceso.

El efecto citopático (CPE) fue visible en algunas células a partir de las 72 horas, sin embargo, al día 5 fue visible en un 90% de las células (figura 12).

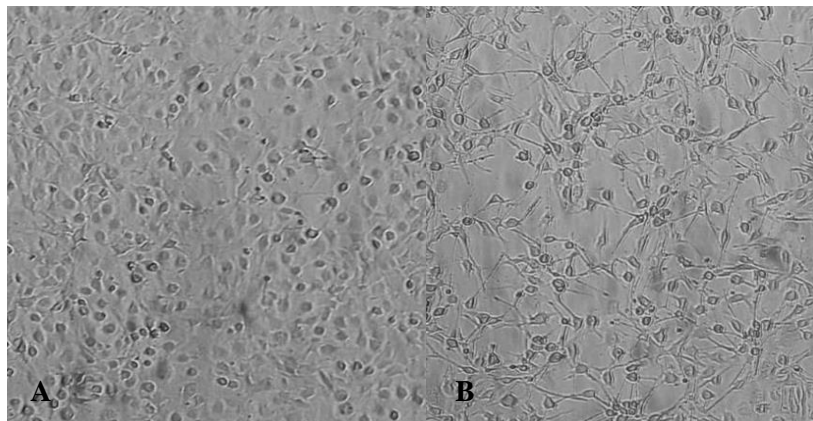


Figura 12. Efecto citopático en células A549. A) imagen de las células a las 24 horas; B) imagen de las células al día 5 post-inoculación.

Posterior a la observación del CPE, las muestras se procesaron mediante RT-PCR semi-anidado bajo las condiciones ya descritas, sin embargo, resultaron negativas.

4.5. Detección por RT-PCR semi-anidado

4.5.1. Extracción y cuantificación de muestras

Se realizó extracción de ARN de los sueros humanos que resultaron seropositivos (5 muestras), pools de excremento porcino (19 pools), tejido hepático de ratas (13 muestras) y medio sobrenadante de los pasajes finales realizados en el cultivo celular (10 muestras).

En esta fase del experimento, se incluyó una muestra única de agua residual en los corrales cerdos de una granja que resultó seropositiva tanto en humanos como en los

animales. La muestra correspondía al municipio de Cadereyta Jiménez en Nuevo León. Esto con el fin de obtener un control positivo.

Para hacer eficiente el método de RT-PCR semi-anidado, el ARN fue cuantificado. Se obtuvo entre 136.12 – 980.40 ng/μl de las muestras de excremento y tejido hepático, y 9.5 - 30.89 ng/μl en las muestras de sueros humanos y sobrenadantes de cultivo celular. Estas cifras fueron ajustadas a los requerimientos del estuche comercial utilizado para la RT-PCR unificando las muestras entre 10 pg – 1 μg.

4.5.2. Detección del VHE por RT-PCR semi-anidado

Previo al procesamiento de las muestras clínicas se sometió la muestra de agua residual a la RT-PCR semi-anidada bajo las condiciones ya mencionadas. Se realizó electroforesis y tras la visualización del gel de agarosa, se observó un producto amplificado del tamaño esperado (212 pb), sin embargo, también fueron visibles bandas inespecíficas (Figura 13) por lo que se consideró como una muestra sospechosa y se preparó para su secuenciación.

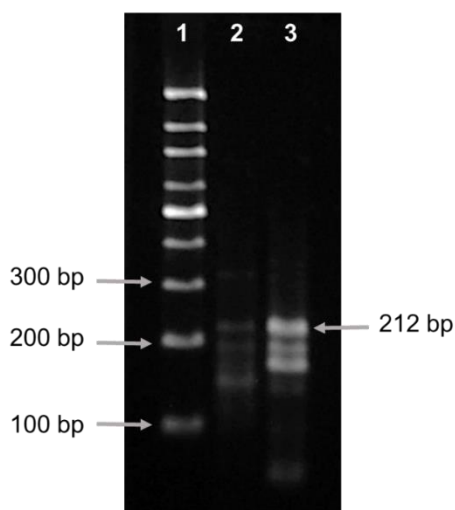


Figura 13. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada del agua residual. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: Muestra de DNA de agua residual.

Esta muestra fue re-amplificada bajo las mismas condiciones para su la purificación a partir de gel de agarosa (véase en el apartado 3.9). Una vez que se purificaron los fragmentos de interés se realizó electroforesis para visualizar el único fragmento de interés (Figura 14).

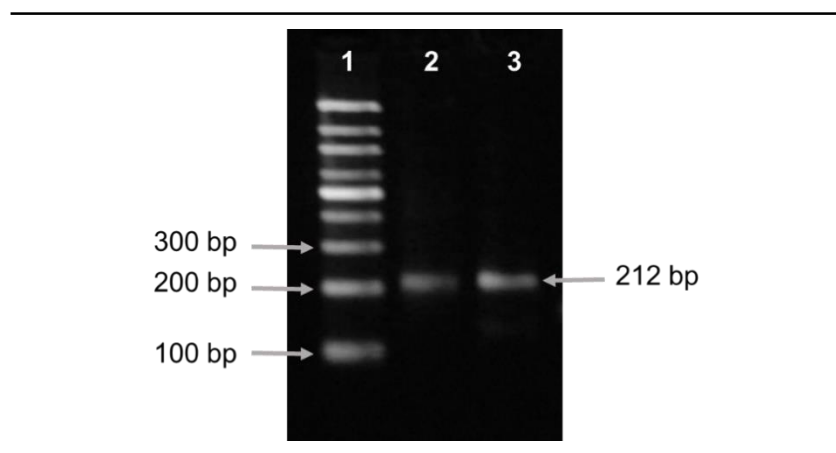


Figura 14. Resultado de la electroforesis posterior a la purificación del cDNA del fragmento de interés. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: Muestra de DNA purificado de agua residual.

La muestra se preparó para su envío a una fuente comercial para su secuenciación, obteniendo la siguiente secuencia consenso tras su edición con el programa Editseq:

**5'AAGTGTAAATCCTTCATGAAACGTGTGGCTGCTGTGGTGGTAAGCTCA
GCAGTCCCATCGGCACCGCGACGCAGCCGGTGGCGGGCTGTACTGGTG
TACCGGGAAACACGGGTGTTGGTATTCCCGGGTGTCTAATTTCTAAATT
3'**

Esta secuencia se introdujo en el programa BLAST® y arrojó como resultado un porcentaje de identidad del 95.86% con las secuencias reportadas por Huang et al., 2002 (AF466682) y Sun et al., 2003 (AY870833), mismas que corresponden a una región genética de la proteína de la cápside del VHE.

En base a los resultados anteriores, se procesaron las muestras clínicas tomando en cuenta ésta muestra como control positivo con su uso a partir del ARN purificado. Las muestras de los sueros humanos seropositivos y sobrenadantes de cultivo celular resultaron negativas.

No obstante, un 11% (2/19) de los pools de excremento resultaron positivas. Estas muestras correspondieron a los municipios de Salinas Victoria y Cadereyta Jiménez (Figura 15).

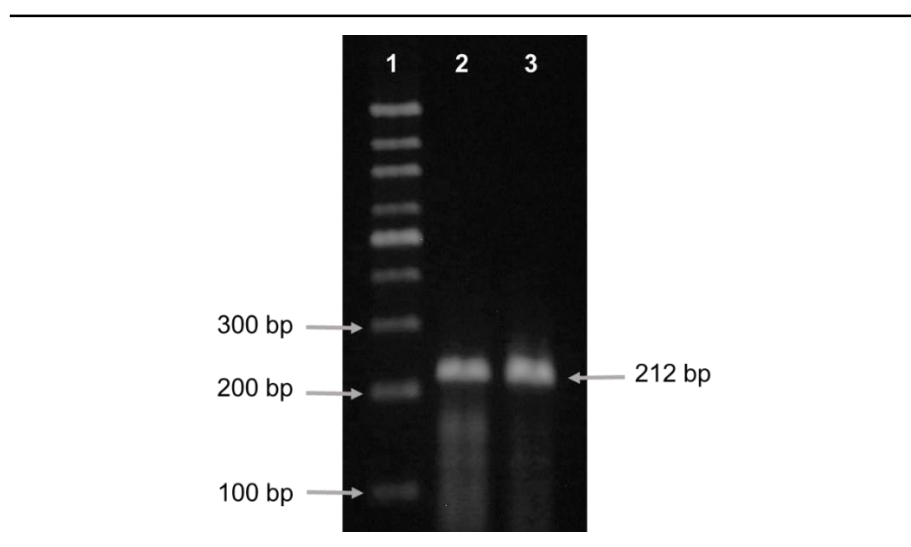


Figura 15. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada muestras de excremento. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Pool de excremento de granja tecnificada en Salinas Victoria; Carril 3: Pool de excremento de granja de traspaso en Cadereyta Jiménez.

Finalmente, el tejido hepático procedente de 13 ratas capturadas. Se encontró un 15% (2/13) de muestras positivas al ARN-VHE (Figura 16). los dos especímenes que resultaron positivos provenían de los municipios Cadereyta Jiménez y Dr. González.

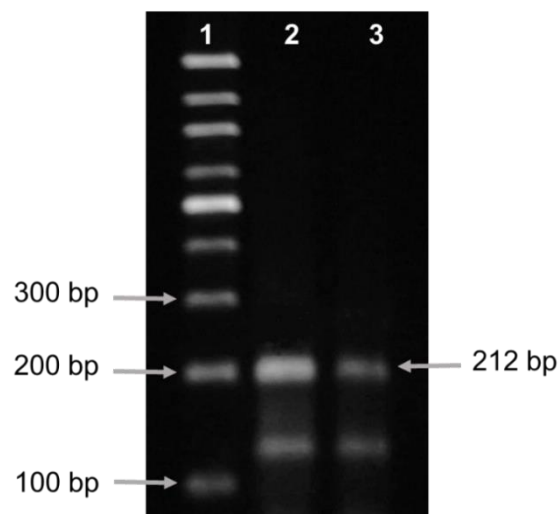


Figura 16. Resultado de la electroforesis del producto amplificado de la RT-PCR semi-anidada muestras de tejido hepático en ratas. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Muestra de hígado de rata proveniente de granja de traspatio en Cadereyta Jiménez; Carril 3: Muestra de hígado de rata proveniente de granja tecnificada en Dr. González;

5. DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos de serología del presente estudio, se encontró una alta seropositividad tanto en humanos y cerdos en las unidades de riesgo porcino. Pocos estudios han evidenciado la presencia del VHE tanto en especies susceptibles como en unidades de producción con riesgo de contagio.

En México se sabe que el riesgo de la infección por el VHE es mayor en ciertos grupos de la población humana. Por ello, algunos estudios se han enfocado en poblaciones específicas y han reportado 36.6% (100/273) de seropositividad en poblaciones rurales de Durango (Alvarado et al., 2014), 6.7% (10/150) de seropositividad en menonitas (Alvarado et al., 2015) y 3.4% (5/146) en Tepehuanos (grupo étnico nativo de México) (Alvarado et al., 2020). No obstante, estos estudios no especifican la búsqueda de un genotipo determinado. Así mismo, actualmente no se han estudiado poblaciones con riesgo ocupacional, es decir, individuos que mantengan contacto con animales susceptibles o reservorios a esta infección.

En el presente estudio se consideraron rastros porcinos, granjas tecnificadas y de traspatio donde la susceptibilidad por la exposición ocupacional ha sido reportada como un factor de riesgo (Teixeira, et al., 2017). Se encontró que el 20% (5/25) de los humanos que laboran en estas unidades de riesgo porcino del noreste de México son seropositivos al VHE.

En otros países, en un artículo de revisión de De Schryver et al. (2015) quienes analizaron la transmisión ocupacional al hombre, en EE. UU., Rusia, Reino Unido, sur de Francia y Asia la seroprevalencia varió entre 18.2-20.6%, por lo que, aunque los muestreos se realizaron considerando un mayor tamaño de muestras, nuestros resultados son compatibles dentro del rango con los obtenidos en otras regiones del mundo.

Englobando los resultados de serología de los cerdos y unidades de riesgo, un estudio reciente donde se colectaron sueros porcinos de granjas tecnificadas de 27 estados de la república, se encontró un 83.3% seropositividad en el norte del país (García et al., 2017), similar a los resultados aquí obtenidos, donde se encontró una seropositividad del 79% (50/63) en cerdos provenientes de granjas porcinas tecnificadas.

No obstante, no existen estudios de seroprevalencia en cerdos de traspatio y tampoco se conoce la población total de éstos, lo que ocasionan obstáculos para conocer la distribución y frecuencia de la infección por el VHE.

García et al. (2017), reportan que ausencia de seropositividad en muestras de suero porcino de Coahuila, lo cual contrasta con nuestros resultados, obteniendo un 23% (3/13) de granjas seropositivas y un 50% (6/12) cerdos seropositivos provenientes de granjas tecnificadas.

Comparando la seropositividad porcina de Nuevo León, (49%; 57/116) y de Coahuila con un 50% (6/12) con otros estados del norte del país, en Sinaloa se ha reportado 63% de seropositividad en granjas tecnificadas (García et al., 2017).

Por otro lado, aunque en otros países se ha reportado un 28.6% seropositividad en ratas (*Rattus norvergicus*) provenientes de granjas porcinas con cerdos seropositivos (Kanai et al., 2012), las ratas en este estudio no resultaron seropositivas. Esto puede estar influenciado por la prueba serológica usada, ya que, el análisis de RT-PCR en tejido hepático se pudo evidenciar que un 15% (2/13) de las ratas son positivas a secuencias genéticas del VHE. Aunque las ratas son hospederas de cepas zoonóticas de VHE típicas de la especie (Sridhar et al., 2021), se tienen pocos reportes como especie susceptible y portador del VHE-3 (Lack et al., 2012; De Sabato et al., 2020). Un estudio reciente, De Sabato y col. (2020) reportaron un 2% (1/47) de positividad en ratas provenientes de granjas porcinas e identificaron que se trataba del VHE-3 subtipo e (cepa porcina), lo cual contrasta con nuestros resultados

Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis para determinar factores asociados a la presencia y ausencia del VHE (contacto de los cerdos con otros animales domésticos, falta de tapete sanitario, cuarentena de animales y sistema intensivo), coinciden con las variables analizadas por López, et al., 2018, en donde evaluó los factores de riesgo asociados a una mayor prevalencia de infección por VHE en distintos sistemas de producción porcina. En este estudio se determinó que la ausencia de tapete o vado sanitario, la falta de cuarentena y el contacto de los cerdos con otras especies domesticas favorece la presencia y transmisión del VHE. Así mismo demostró que los cerdos criados

en granjas extensas tienen mayor riesgo de infección que aquellos en los criados en sistemas intensivos.

Como una enfermedad zoonótica, es importante un control y monitoreo de las granjas de traspatio, así como también, mejorar las medidas de bioseguridad en granjas tecnificadas. Esto no solo para minimizar el riesgo de transmisión zoonótica en las unidades de producción, si no también, la transmisión entre animales y reducir el riesgo en la canal y consumo de alimentos derivados del cerdo.

Los resultados de la detección molecular del VHE en los medios sobrenadantes de los cultivos celulares, sueros humanos seropositivos, y pools de excremento porcino fueron muy variados.

El efecto citopático en los cultivos celulares fue evidente y similar a lo observado por Shen y col (2014); sin embargo, el virus no fue detectado con técnicas y procedimientos moleculares empleados. Esto puede deberse a muchos factores, aunque las células A549 son ideales para estos procedimientos, generalmente extraen las muestras de humanos durante la fase aguda y la inoculación es realizada con un número de partículas virales determinado (Quintero et al., 2019) lo cual mejora los resultados. Se ha reportado que incluso con una técnica estandarizada el recuento de las partículas virales puede ser bajo (Fu et al., 2019). Por otro lado, debido a que el inoculado procedía de excremento porcino, no se descarta la posibilidad de la existencia que otros virus entéricos que produjeron estos efectos en las células y/o compitieron con el VHE.

En cuanto a los sueros humanos seropositivos que resultaron negativos en la RT-PCR semi-anidada, es necesario considerar que los anticuerpos IgG detectados en las pruebas serológicas, no determinan si el individuo cursó recientemente con la enfermedad. A pesar de que las pruebas moleculares se pueden realizar en muestras de suero y excremento (Cooper et al., 2005), los investigadores generalmente optan por la detección en muestras fecales en las distintas especies susceptibles.

Los pools de excremento porcino analizadas de cada unidad resultaron en 11% (2/19) de positividad. A diferencia de los resultados de serología, el bajo porcentaje de positividad se explica debido a que uno de los principales obstáculos es identificar un

animal en la fase de viremia, para así facilitar la detección del VHE en excremento (Meester et al., 2021). A pesar de ello, en Latinoamérica Passos et al. (2017) reportaron un 20% (34/170) de muestras fecales porcinas positivas, 9% más que en el presente estudio

Sin embargo, referente a la muestra analizada con el propósito de obtener un control positivo, un estudio en Brasil reportó un 89% (8/9) de muestras positivas. Estas muestras correspondían a muestras de estiércol de lagunas de purines (Vasconcelos et al., 2015), lo que pudiera suponer que este tipo de muestras obtenidas de lugares en donde se acumula el desecho de los cerdos, son una fuente propicia para determinar la presencia del VHE en una unidad de producción.

6. CONCLUSIONES

*El VHE está ampliamente disperso en las granjas porcícolas del noreste de México.

*El alto porcentaje de individuos seropositivos ocurre a nivel de granjas, lo cual, se ve reflejado en la seropositividad detectada en rastros, no obstante, contrasta con la ausencia o baja seropositividad en cerdos de traspatio.

*La presencia de secuencias genéticas del virus en excremento porcino constituye un riesgo para la adquisición de la infección en la población laboralmente expuesta o a la población en general, si el virus contamina afluentes o material fuera de la granja. La detección de anticuerpos y el cálculo de su frecuencia realizado en humanos que se dedican a la porcicultura, indican que el contacto directo o indirectos con porcinos podría colocarlos en situación de riesgo.

*Se reporta la actividad del VHE en ratas que conviven con los cerdos en las granjas, que eventualmente puede jugar un papel importante en mantener la infección en las poblaciones y área estudiada.

*Con la metodología usada no fue posible la detección de anticuerpos en las ratas, por lo que será importante tomar en consideración esta observación en el diseño de estudios posteriores que permitan seleccionar correctamente la prueba diagnóstica a utilizar y evitar resultados erróneos y falsas interpretaciones cuando se investigue el papel de esta especie en la epidemiología del virus.

*En este trabajo se reportan hallazgos no conocidos en el país de la infección del VHE. Por lo que con los resultados obtenidos de humanos y ratas provenientes de las granjas porcinas podrían tomarse como base futuras investigaciones con el objetivo de ampliar la información epidemiológica del VHE en México.

*No se logró aislar el virus en cultivo células A549 de carcinoma de pulmón humano. No obstante, es importante estandarizar técnicas de diagnóstico que sean viables para detectar e identificar el VHE en distintas especies susceptibles.

*El análisis parcial de las secuencias genéticas detectadas revelan una alta homología con el VHE-3, por lo que es muy probable la alta frecuencia de este genotipo en la población estudiada; sin embargo, no se descarta la presencia de otros genotipos dadas las limitaciones del estudio.

*Acorde a lo observado, se acepta la hipótesis que afirma presencia y circulación del virus de hepatitis E en porcinos, murinos y humanos que cohabitan en unidades de riesgo en los Estados de Nuevo León y Coahuila de Zaragoza, México.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abravanel, F., Lhomme, S., El Costa, H., Schvartz, B., Peron, J., Kamar, N. y Izopet, J. (2017). *Emerging Infectious Diseases*, 23 (7), 1191-1193.
- Aggarwal, R. y Jameel, S. (2011). Hepatitis E. *Hepatology*, 54 (6), 2218-2226.
- Alvarado, C., Gutiérrez, V., Ramírez, E. y Sifuentes, A. (2020). Low prevalence of anti-hepatitis E Virus IgG antibodies in Tepehuanos in Mexico. *Annals of Hepatology*, 19 (2), 186-189.
- Alvarado, C., Sanchez, L. y Hernandez, J. (2014). Seroepidemiology of hepatitis e virus infection in general population in rural durango, Mexico. *Hepatitis Monthly*, 14(6), 1-6.
- Alvarado, C., Sánchez, L. y Hernández, J. (2015). Seroepidemiology of hepatitis e virus infection in mennonites in Mexico. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(2), 103-108.
- Alvarado, C., Sanchez, L. y Hernandez, J. (2019). Hepatitis E virus exposure in pregnant women in rural Durango, Mexico. *Annals of Hepatology*, 13 (5), 510-517.
- Andraud, M., Casas, M., Pavio, N. y Rose, N. (2014). Early-life hepatitis e infection in pigs: the importance of maternally-derived antibodies. *PLoS One*, 9 (8), 1-8.
- Aspinall, E., Counturier, E., Faber, M., Said, B., Ijaz, S., Tavošchi, L., Takkinen, J. y Adlhoch, C. (2017). Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Surveillance and Outbreak report*, 22(26), 1-10.
- Backer, J., Berto, A., McCreary, C., Martelli, F. y Van Der Poel, W. (2012). Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics*, 4 (2), 86-92.
- Brody, J.R., Kern, S.E., 2004. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for ADN electrophoresis. *Biotechniques*. doi:10.1677/ERC-09-0222.
- Cantú, M., Roig, A., Cedillo, S., Zamora, D., Avalos, R. (2013). Detección molecular del virus de la hepatitis E en hígados de cerdo destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México. *Salud Pública de Mexico*, 55 (2), 193-195.

- Cao, D. y Meng, X. (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes and Infections*, 1, 1-10.
- Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J., Chawla, Y., Kaur, U. y Ganguly, N. (1993). Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet*, 341 (8838), 149-150.
- Cooper, K., Huang, F., Batista, L., Rayo, C., Bezanilla, J., Toth, T. y Meng, X. (2005). Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (4), 1684-1688.
- De Sabato, L., Amoroso, M., Ianiro, G., Esposito, C., De Grossi, L., Fusco, G., Barone, A., Martini, E., Ostanello, F. y Di Bartolo, I. (2020). Detection of Hepatitis E Virus in Livers and Muscle Tissues of Wild Boars in Italy. *Food and Environmental Virology*, 12 (1), 1-8.
- De Sabato, L., Ianiro, G., Monini, M., De Lucia, A., Ostanello, F. y Di Bartolo, I. (2019). Detection of hepatitis E virus RNA in rats caught in pig farms from Northern Italy. *Zoonoses and Public Health*, 67, 62-69.
- De Schryver, A., Schrijver, K., François, G., Hambach, R., van Sprundel, M., Tabibi, R. y Colosio, C. (2015). Hepatitis E virus infection: an emerging occupational risk?. *Occupational Medicine*, 65(8), 667-672.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Morandi, F., Ostanello, F. y Ruggeri, F. (2017). Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64 (1), 137-143.
- Di Pasquale, S., De, Santis, P., La Rosa, G., Di Domenico, K., Iaconelli, M., Micarelli, G., Martini, E., Bilei, S., De Medici, D. y Suffredini, E. (2019). Quantification and genetic diversity of Hepatitis E virus in wild boar (*sus scrofa*) hunted for domestic consumption in Central Italy. *Food Microbiology*, 82, 194-201.
- Dirección general de Epidemiología (DGE). (2012). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las hepatitis virales. Recuperado de: https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/11_Manual_HepatitisVirales.pdf

- Emerson, S. y Purcell, R. (2003). Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology*, 13 (3), 145-154.
- Ferri, G. y Vergara, A. (2019). Hepatitis E Virus in the Food of Animal Origin: A Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(6), 368-377.
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M. y Sironi, M. (2018). Origin and dispersal of Hepatitis E virus. *Emerging Microbes and Infections*, 7 (1), 1-13.
- Fousekis, F., Mitselos, I. y Christodoulou, D. (2019). Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus: An overview. *Clinical and Molecular Hepatology*, 26, 16-23.
- Fu, R., Decker, C. y Thi, V. (2019). Cell Culture Models for Hepatitis E Virus. *Viruses*, 11(7), 608.
- García, I., Rivero, A., Caballero, J., López, P., Cano, D., Frías, M., Jiménez, S., Rialde, M., Gómez, J. y Rivero, A. (2019). Hepatitis E virus infection in equines in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (1), 66-71.
- García, M., Cruz, M., Sánchez, J., Rico, O., Vergara, A., Trujillo, M. y Sarmiento, R. (2017). Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Veterinary Research*, 13 (1), 1-5.
- García, N., Hernández, M., Gutiérrez, M., Valero, A., Navarro, A., Muñoz, M., Fernández, A., Matías, F., Martínez, I., Bárcena, C., González, S., Avellón, A., Eiros, J., Fongaro, G., Domínguez, L., Goyache, J. y Rodríguez, D. (2019). Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-10.
- Girones, R., Carratalà, A., Calgua, B., Calvo, M., Rodríguez, J. y Emerson, S. (2014). Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *Journal of Water and Health*, 12 (3), 436-442.
- Gupta, S. (2018). Viral Hepatitis: Historical Perspective, Etiology, Epidemiology, and Pathophysiology. En Gupta, S. (primera edición), *Studies on Hepatitis Viruses: Life Cycle, Structures, Functions, and Inhibition* (págs. 1-14). Elsevier.

- Hakze-van Der Honing, R., Coillie, E., Antonis, F. y Van Der Poel, W. (2011). First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PloS One*, 6 (8), 1-6.
- Hammerchmidt, F., Schwaiger, K., Dahnert, L., Vina-Rodriguez, A., Hoper, D., Gareis, M., Groschup, M. y Eiden, M. (2017). Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany. 64 (8), 612-622.
- Holla, P., Ahmad, I., Ahmed, Z. y Jameel, S. (2015). Hepatitis E Virus Enters Liver Cells Through a Dynamin-2, Clathrin and Membrane Cholesterol-Dependent Pathway. *Traffic*, 16 (4), 398-416.
- Huang, F., Haqshenas, G., Guenette, D., Halbur, P., Schomer, S., Pierson, F., Toth, T. y Meng, X. (2002). Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States, *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), 1326-1332.
- Huang, Q., Baum, L., Fu, W.L., 2010. Simple and practical staining of ADN with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clin. Lab*.
- Huang, R., Nakazono, N., Ishii, K., Li, D., Kawamata, O., Kawaguchi, R. y Tsukada, Y. (1995). Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *Journal of Medical Virology*, 47 (4), 299-302.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). (2017). Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487413/LVL_HepatitisV_4T.pdf
- Jirintai, S., Tanggis, Mulyanto, Suparyatmo, J., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T. y Okamoto, H. (2014). Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines
- Johne, R., Trojnar, E., Filter, M. y Hofmann, J. (2016). Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (14), 4225-4231.
- Ju, X. y Ding, Q. (2019). Hepatitis E virus assembly and release. *Viruses*, 11(6), 2-13.

- Kabrane, Y., Fine, B., Elm, J., Glass, G., Higa, H., Diwan, A., Gibbs, C., Meng, X., Emerson, S. y Purcell, R. (1999). Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61 (2), 331-335.
- Kadaré, G. y Haenni, A. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71, 2583-2590.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S., Sehgal, D. y Jameel, S. (2009). Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *Journal of Virology*, 83(24), 12714-12724.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand, F., Xia, N., Ijaz, S., Izopet, J. y Dalton, H. (2012). Hepatitis E. *Lancet*, 379 (9835), 2477-2488.
- Kamar, N., Izopet, J. y Dalton, H. (2013). Chronic hepatitis e virus infection and treatment. *Journal of Clinical and Experimental hepatology*, 3 (2), 134-140.
- Kanai, Y., Miyasaka, S., Uyama, S., Kawami, S., Kato, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K. y Hagiwara, K. (2012). Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. *BMC Research Notes*, 5, 5-4.
- Karras, G., Kustatscher, G., Buhecha, H., Allen, M., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M. y Ladurner, A. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *The EMBO Journal*, 24, 1911-1920.
- Kenney, P. (2019). The current host range of hepatitis E viruses. *Viruses*, 11 (5), 1-21.
- Khuroo, M. (1991). Hepatitis E: the enterically transmitted non-A, non- B hepatitis. *Indian Journal of Gastroenterology*, 10 (3), 96-100.
- Khuroo, M., Khuroo, M. y Khuroo, N. (2016). Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World Journal of Gastroenterology*, 22 (31), 7030-7045.
- Krawczynski, K., Meng, X. y Rybczynska, J. (2011). Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus research*, 161 (1), 78-83.

- Krog, J., Larsen, L y Breum, S. (2019). Tracing Hepatitis E Virus in Pigs From Birth to Slaughter. *Frontiers in Veterinary Science*, 6 (50), 1-7.
- Lack, J., Volk, K. y Van Den Bussche, R. (2012). Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wild Rats, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 18 (8), 1268-1273.
- LeDesma, R., Nimgaonkar, I. y Ploss A. (2019). Hepatitis E Virus Replication. *Viruses*, 11 (179), 1-17.
- Lee, G., Tan, B., Teo, E., Lim, S., Dan, Y., Wee, A., Kim, P., Zhu, Y., Hibberd, M., Tan, C., Purdy, M. y Teo, C. (2015). Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, 150 (2), 355-357.
- Li, T. y Wakita, T. (2019). Small Animal Models of Hepatitis E Virus Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9 (8), 1-12.
- Li, T., Yang, T., Yoshizaki, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Ishii, K., Haga, K., Nakamura, T., Ochiai S., Takaji, W. y Johne, R. (2015). Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology*, 96 (6), 1320-1327.
- Long, F., Yu, W., Yang, C., Wang, J., Li, Y., Li, Y. y Huang, F. (2017). High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *Journal of Medical Virology*, 89 (11), 1981-1987.
- Lopez, P., de los Angeles, M., Frias, M., Garcia, I., Brieva, T., Caballero, J., Camacho, A., Fernandez, V., Machuca, I., Gomez, J., Rivero, A. y Rivero, A. (2018) Risk factors associated with hepatitis E virus in pigs from different production systems. *Veterinary Microbiology*, 224, 88-92.
- Magden, J., Takeda, N., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits, A. y Kääriäinen, L. (2001). Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *Journal of Virology*, 75 (14), 6249-6255.
- Martin, M., Segalés, J., Huang, F., Guenette, D., Mateu, E., de Deus, N. y Meng, X. (2007). Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting síndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Veterinary Microbiology*, 122, 16-24.

- Medrano, C., Boadella, M., Barrios, H., Cantú, A., García, Z., de la Fuente, J. y Gortazar, C. (2012). Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 18 (8), 1372-1374.
- Meester, M., Tobias, T., Bouwknegt, M., Kusters, N., Stegeman, J. y Van der Poel, W. (2021). Infection dynamics and persistence of hepatitis E virus on pig farms - a review. *Porcine Health Management*, 7(1), 1-16.
- Meister, T., Bruening, J., Todt, D. y Steinmann, E. (2019). Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Research*, 163, 34-49.
- Meng, X. (2016). Expanding Host Range and Cross-Species Infection of Hepatitis E Virus. *PLoS Pathogens*, 12 (8), 2-7.
- Meng, X., Purcell, R., Halbur, P., Lehman, J., Webb, D., Tsareva, T., Haynes, J., Thacker, B. y Emerson, S. (1997). A novel virus in wine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 94 (18), 9860-9865.
- Merino, T., Martin, M., Casal, J., Saiz, J. y Loza, E. (2016). Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food and Environmental Virology*, 8 (2), 156-159.
- Montalvo, M., Cruz, D., Ahmad, I., Rodríguez, L., Bello, M., Guevara, C., Sánchez, L., Sánchez, L. y Jameel, S. (2017). Hepatitis E virus in bottlenose dolphins *Tursiops Truncatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 123, 13-18.
- Mori, Y. y Matsuura, Y. (2011). Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Research*, 161 (1), 59-64.
- Mulder, A., Kroneman, A., Franz, E., Vennema, H., Tulen, A., Takkinen, J., Hofhuis, A. y Adlhoch, C. (2019). HEVnet: a One Health, collaborative, interdisciplinary network and sequence data repository for enhanced hepatitis E virus molecular typing, characterization and epidemiological investigations. *Eurosurveillance*, 24 (10), 1-6.
- Nicolini, L., Stoney, R., Vecchia, A., Grobush, M., Gautret, P., Angelo, K., Genderen, P., Bottieau, E., Leder, K., Asgeirsson, H., Leung, D., Connor, B., Pandey, P., Toscanini, F.,

- Gobbi, F., Castelli, Bassetti, M. y Hamer, D. (2020). Travel-related hepatitis E: a two-decade GeoSentinel analysis. *Journal of Travel Medicina*, 27 (7), ...
- Nidaira, M., Takahashi, K., Ogura, G., Taira, K., Okano, S., Kudaka, J., Itokazu, K., Mishiro, S. y Nakamura, M. (2012). Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74 (12), 1665-1668.
- Oechslin, N., Moradpour, D. y Gouttenoire, J. (2020). On the Host Side of the Hepatitis E Virus Life Cycle. *Cells*, 9 (5), 1-14.
- Panduro, A., Escobedo, G., Fierro, N., Ruíz, B., Zepeda, E. y Román, S. (2011). Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud pública de México*, 53 (1), 37-45.
- Passos, A. y Hernández, C. (2017). High frequency of hepatitis E virus infection in swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates. *Veterinary Microbiology*, 48 (2), 373-379.
- Pavio, N., Meng, X. y Doceul, V. (2015). Zoonotic origin of hepatitis E. *Current Opinion in Virology*, 10, 34-41.
- Pérez, M., García, M., Suay, B. y Mateos, M. (2015). Current Knowledge on Hepatitis E. *Journal of Clinical and Translation Hepatology*, 3 (2), 117-126.
- Pillot, J., Sharma, M., Lazizi, Y., Budkowska, A., Dauguet, C., Galimand, M. y Sarthou, J. (1987). Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic and sporadic non-A,non-B hepatitis. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, 138 (1), 145-158.
- Pischke, S. Hartl, J., Pas, S., Lohse, A., Jacobs, B. y Van der Eijk, A. (2017). Hepatitis E virus: Infection beyond the liver?. *Journal of Hepatology*, 66, 1082-1095.
- Purdy, M., Harrison, T., Jameel, S., Meng, X., Okamoto, H., Van der Poel, H. y Smith, D. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *Journal of General Virology*, 98 (11), 2645-2646.

- Quintero, G., Mirazo, S., Suescun, J., Lopez, A., Mainardi, V., Arbiza, J. y Orduz, S. (2019). Cell culture isolation of Hepatitis E Virus Genotype 3 Strain obtained from human feces. *Acta Biológica Colombiana*, 24 (3), 503-508.
- Realpe, M., Viera, O. y Fierro, N. (2018). Hepatitis E Virus: Still an Enigma in Mexico. *Annals of Hepatology*, 17 (4), 544-546.
- Rivadulla, E., Varela, M., Mesquita, J., Nascimento, M. y Romalde, J. (2019). Detection of Hepatitis E Virus in Shellfish Harvesting Areas from Galicia (Northwestern Spain). *Viruses*, 11 (7), 618.
- Rivero, A., Frias, M., Martinez, A., Rialde, M., Rodrigues, D., Camacho, A., Garcia, I., Cuenca, F., Gomez, J. y Rivero, A. (2017). Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption. *Zoonoses and Public Health*, 64 (7), 561-565.
- Rodríguez, F., Jardi, R. y Buti, M. (2012). Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(10), 624-634.
- Ruggeri, F. (2013). Epidemiology of the Human HEV Infection. Ruggeri, F., Di Bartolo, I., Ostanello, F. y Trevisani, M. (1era edición). *Hepatitis E Virus An Emerging Zoonotic and Foodborne Pathogen* (págs. 11-20).
- Salines, M., Dumarest, M. Andraud, M., Mahé, S., Barnaud, E., Cineux, M., Eveno, E., Eono, F., Dorenlor, V., Grasland, B., Bourry, O., Pavio, N. y Rose, N. (2019). Natural viral co-infections in pig herds affect hepatitis E virus (HEV) infection dynamics and increase the risk of contaminated livers at slaughter. *Transboundary and Emerging Disease*, 66 (5), 1930-1945.
- Sarchese, V., Di Profio, F., Melegari, I., Palombieri, A., Bermudez, S., Arbuatti, A., Ciuffetelli, M., Marsilio, F., Martella, V. y Di Martino, B. (2019). Hepatitis E virus in sheep in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (3), 1120-1125.
- Sarmiento, R. y Arenas, F. (2019). Hepatitis E in Latin America. *Annals of Hepatology*, 18 (4), 541-542.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. y Esko, J. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1-33.

- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA) (2009). Fortalecimiento de porcicultura en Nuevo León. Obtenido de: <https://www.gob.mx/agricultura/nuevoleon/articulos/sagarpa-reporta-fortalecimiento-de-porcicultura-en-nuevo-leon?idiom=es>
- Segura-Correa, J.C. (2008). EpiMuestra. Un programa para el cálculo del tamaño de muestra para estudios epidemiológicos. Versión 1. Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán; México.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (2017). Obtenido de: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/certificada-en-buenas-practicas-pecuarias-30-por-ciento-de-la-produccion-nacional-de-cerdo>.
- Shen, Q., Pu, Y., Fu, X., Xie, Y., Bian, X., Yang, S., Yang, Y., Cui, L., Wang, X., Wang, H. y Zhang, W. (2014). Changes in the cellular proteins of A%\$) infected with Hepatitis E virus by Proteomics analysis. BMC Veterinary Research, 10:188, 1-8.
- Shukla, P., Nguyen, H., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R. y Emerson, S. (2012). Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. Journal of Virology, 86 (10), 5697-5707.
- Shukla, P., Nguyen, H., Torian, U., Engle, R., Faulk, K., Dalton, H., Bendall, R., Keane, F., Purcell, R. y Emerson, S. (2011). Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus–host recombinant. PNAS, 108 (6), 2438-2443.
- Smith, D., Izopet, J., Nicot, F., Simmonds, P., Jammal, S., Meng, X., Norder, H., Okamoto, H., Van Der Poel, W., Reuter, G. y Purdy, M. (2020). Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). The Journal of General Virology, 101 (7), 692-698.
- Smith, D., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S., Harrison, T., Meng, X., Okamoto, H., Van der Poel, W. y Purdy, M. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. Journal of Virology, 95 (1), 2223-2232.

- Smith, D., Vanek, J., Ramalingam, S., Johannessen, I., Templeton, K. y Simmonds, P. (2012). Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region. *Journal of General Virology*, 93 (11), 2408-2418.
- Sooryanarain, H. y Meng, X. (2019). HepatitisE virus: reasons for emergence in humans. *Current Opinion in Virology*, 34, 10-17.
- Spahr, C., Knauf-Witzens, T., Vahlenkamp, T., Ulrich, R. y Johne, R. (2017). Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health*, 65 (1), 1-19.
- Sridhar, S., Yip, C., Wu, S., Chew, N., Leung, K., Chan, J., Zhao, P., Chan, W., Poon, R., Tsoi, H., Cai, J., Chan, H., Leung, A., Tse, C., Zee, J., Tsang, O., Cheng, V., Lau, S., Woo, P., Tsang, D. y Yuen, K. (2021). Transmission of Rat Hepatitis E Virus Infection to Humans in Hong Kong: A Clinical and Epidemiological Analysis. *Hepatology*, 73(1), 10-22.
- Sun, Z., Huang, F., Halbur, P., Schommer, S., Pierson, F., Toth, T. y Meng, X. (2003). Use of heteroduplex mobility assays (HMA) for pre-sequencing screening and identification of variant strains of swine and avian hepatitis E viruses. *Veterinary Microbiology*, 96(2), 165-176.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Sato, H., Sato, Y., Nagashima, S. y Okamoto, H. (2011). Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *The Journal of General Virology*, 92, 902-908.
- Takahashi, M., Tanaka, T., Takahashi, H., Hoshino, Y., Nagashima, S., Mizuo, H., Yazaki, Y., Takagi, T., Azuma, M., Kusano, E., Isoda, N., Sugano, K. y Okamoto, H. (2010). Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48 (4), 1112-1125.
- Tanaka T., Takahashi, M., Kusano, E. y Okamoto, H. (2007). Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *The Journal o General Virology*, 88, 903-911.

- Tanaka, T., Takahashi, M., Takahashi, H., Ichiyama, K., Hoshino, Y., Nagashima, S., Mizuo, H. y Okamoto H. (2009). Development and characterization of a hepatitis E virus genotype 4 cell culture system using the HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6), 1906-1910.
- Teixeira, J., Mesquita, J., Pereira, S., Oliveira, R., Abreu, J., Rodrigues, A., Myrmel, M., Stene, K., Øverbø, J., Gonçalves, G. y Nascimento, M. (2016). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(1), 77-81.
- Van del Heijden, M. y Bol, J. (2002). Composition of alphavirus-like replication complexes: involvement of virus and host encoded proteins. *Archives of Virology*, 147 (5), 875-898.
- Vasconcelos, J., Soliman, M., Staggemeier, R., Heinzelmann, L. Weidlich, L., Cimirro, R., Esteves, P., Silva, A. y Spilki, F. (2015). Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Veterinary Medicine*, 67(3), 777-782.
- Vercouter, A., Sayed, I., Lipkens, Z., De Bleecker, K., De Vlieghe, S., Colman, R., Koppelman, M., Supré, K. y Meuleman, P. (2018). Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 54-59.
- Vermeji, P., De, Groof, Schrier, C. y Vogels, W. (2019). EE. UU. HEV vaccine. Patente No. US 2019/0151442 A1, Internet Inc., Madison, NJ.
- Wang, B. y Meng, X. (2021). Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection. *Current Opinion in Microbiology*, 59, 8-12.
- Weger, S., Elkin, B., Lindsay, R., Bollinger, T., Crishton, V. y Andonov, A. (2017). Hepatitis E Virus Seroprevalence in Free-Ranging Deer in Canada. *Transboundary and emerging diseases*, 64 (3), 1008-1011.
- Williams, T., Kasorndorkbua, C., Halbur, P., Haqshenas, G., Guenette, D., Toth, T. y Meng, X. (2001). Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (9), 3040-3046.

- Woo, P., Lau, S., Teng, J., Cao, K., Wernery, U., Schountz, T., Chiu, T., Tsang, A., Wong, P., Wong, E. y Yuen, K. (2016). New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 22 (12), 2219-2221.
- Yin, X., Li, X. y Feng, Z. (2016). Role of enveloped in the HEV life cycle. *Viruses*, 8(229), 1-8.
- Yugo, D., Cossaboom, C., Heffron, C., Huang, Y., Kenney, S., Woolums, A., Hurley, D., Opriessing, T., Li, L., Delwart, E., Kanevsky, I. y Meng, X. (2019). *Journal of Medical Virology*, 91 (4), 677-686.
- Zeng, M., Gao, H., Yan, X., Qu, W., Sun, Y., Fu, G. y Yan, Y. (2017). High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoonoses and Public Health*, 64 (8), 684-688.
- Zhang, H., Chen, D., Wu, Y., He, Q., Chen, H. y Liu, Z. (2011). Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Virus Research*, 158 (1-2), 289-293.

8. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informativo



FORMULARIO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMATIVO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION MEDICA

Título del estudio: ESTUDIO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS E (VHE) EN CERDOS, MURINOS Y HUMANOS EN LOS ESTADOS DE NUEVO LEÓN Y COAHUILA, MÉXICO.

Título del protocolo: _____

Investigador principal: _____

Nombre del paciente: _____

El presente estudio será realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se le invita a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informativo. Siéntase con la absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le invita a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo determinar la presencia del virus de hepatitis E (VHE) en cerdos, murinos (roedores), y humanos que tengan actividad en sistemas de producción porcina comerciales y de traspatio de los estados de Nuevo León y Coahuila, México.

BENEFICIOS DE ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que el virus de hepatitis E está presente en productos cárnicos derivados del cerdo ya que esta especie actúa como un portador del virus afectándole clínicamente en conjunto con otros agentes patógenos (por ejemplo, circovirus porcino) y también exponiendo a las personas que tienen contacto con los cerdos a adquirir el virus.

Con este estudio conocerá de manera clara si usted ha estado expuesto a este agente. Su contribución ayudaría a establecer estrategias de prevención de este padecimiento.

RIESGOS DE LA TOMA DE SANGRE O VENOPUNCION

Los riesgos de la toma de sangre o venopuncion son mínimos, sin embargo, pueden incluir dolor, inflamación y equimosis (moretón) en la zona de toma. Para prevenir estos riesgos el investigador principal ha tomado medidas que incluyen personal con capacitación y experiencia para la toma de muestras de sangre.

Respecto a la información que se obtenga en caso de que su muestra sea positiva, el investigador principal y su equipo de trabajo se comprometen a respetar la normatividad nacional e internacional en la materia a fin de evitar un abuso o mal uso de la información que se obtenga.

Es su decisión participar o no en este estudio. Si está de acuerdo en participar, deberá firmar este formato de consentimiento informado.

Es libre de retirarse en cualquier momento y se respetara su decisión, no se le obligara a cambiar de opinión ni afectara el trato que usted recibe.

Usted no recibirá pago alguno por la participación voluntaria en este estudio.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar a invitación
- Si acepta participar, puede retirarse en el momento que desee (aun cuando el investigador responsable no se lo solicite), informando las razones de su decisión, el cual será respetada.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación
- En el transcurso del estudio podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.

CONFIDENCIALIDAD

Toda información acerca de usted y la sangre recolectada que este depositada en el sitio de estudio y/o con el medico/investigador principal, será anónima y confidencial. Los datos serán usados solo con fines de investigación y podrá ser consultada solo por el equipo de investigación, miembros del comité de ética de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UANL o autoridades sanitarias, si así lo requieren. Se cumplirá con los enunciados de la ley federal de protección de datos personales en posesión de los particulares.

DUDAS E INFORMACIÓN SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS Y RESULTADOS

Si usted tiene alguna duda o requiere información sobre los procedimientos y el resultado durante el estudio, por favor contacte con el investigador, MVZ. Lorena Leticia Vázquez Avila en el siguiente correo electrónico:

lore.fmvz@gmail.com

este estudio será revisado en el departamento de Virología Veterinaria de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UANL.

Coordinador: Dr. Ramiro Avalos Ramírez

Teléfono: 13404390, ext. 3616

Yo he leído todas las páginas de esta forma de consentimiento y estoy enterado de los riesgos descritos. Voluntariamente acepto y me ofrezco para formar parte de este estudio de investigación.

Nombre del participante

Firma

Fecha

Nombre de Testigo

Firma

Fecha

Nombre de Testigo

Firma

Fecha